

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS
LARGAS TERMINALES REPETIDAS (LTRs) EN
DIFERENTES VARIANTES DEL VIH-1**

TESIS DOCTORAL

Eva Ramírez de Arellano Morales

Madrid, 2007

Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS LARGAS TERMINALES REPETIDAS (LTRs) EN DIFERENTES VARIANTES DEL VIH-1

Esta memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctor en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid por la licenciada:

Dña. Eva Ramírez de Arellano Morales

Director de Tesis:

Dra. África Holguín Fernández

Doctora en Ciencias Biológicas. Investigadora del Sistema Nacional de Salud. Responsable del área de Epidemiología Molecular del VIH-1 del Laboratorio de Biología Molecular. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Carlos III, Madrid.

Codirector de Tesis:

Dr. Vicente Soriano Vázquez

Doctor en Medicina. Jefe de Sección. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Carlos III, Madrid.

VºBº del Director y Codirector de la Tesis:

1. Resumen en inglés	1
2. Introducción	3
2.1. Estructura del VIH.....	4
2.2. Ciclo replicativo del VIH	7
2.3. Variantes del VIH.....	7
2.3.1. Implicaciones clínicas y biológicas de la variabilidad genética del VIH-1.....	10
2.4. Estructura y función del LTR.....	12
2.5. Mecanismo de transcripción de los genes del VIH.....	14
2.6. Factores de unión a la región LTR del VIH-1	18
2.6.1. Factores celulares.....	18
2.6.2. Factores virales.....	21
2.7. Variabilidad genética del LTR en los distintos subtipos del VIH-1	22
2.7.1. Variabilidad intersubtipo en la región U3.....	22
2.7.2. Variabilidad intersubtipo en la región R.....	25
2.7.3. Variabilidad intersubtipo en la región U5.....	26
2.8. Actividad del promotor LTR en distintos subtipos del VIH-1	26
2.9. Actividad del promotor LTR en pacientes con progresión lenta de la enfermedad	29
3. Objetivos	31
4. Pacientes, materiales y métodos	33
4.1. Pacientes.....	34
4.2. Extracción del ADN viral	36
4.3. Amplificación y secuenciación de la región LTR.....	37
4.3.1. Pacientes infectados por distintas variantes del VIH-1	37
4.3.2. Progresores lentos infectados por el subtipo B del VIH-1.....	38
4.4. Determinación del subtipo genético del VIH-1 mediante análisis filogenético.....	39
4.5. Obtención de las secuencias consenso LTR de los diferentes subtipos del VIH-1	41
4.6. Cálculo de frecuencia de mutante.....	41
4.7. Generación de clones moleculares con las secuencias LTR de los distintos subtipos del VIH-1 obtenidas de muestras clínicas	42
4.7.1. Obtención del inserto LTR (U3+R)	42
4.7.2. Obtención del vector plasmídico de expresión (pGL2-Basic)	43

4.7.3.	Digestión	44
4.7.4.	Ligación	45
4.7.5.	Transformación de los plásmidos recombinantes.....	46
4.7.6.	Selección de los plásmidos recombinantes	47
4.7.7.	Amplificación y purificación de los plásmidos recombinantes seleccionados.....	48
4.8.	Ensayos de transfección	49
4.8.1.	Línea celular	50
4.8.2.	Vectores plasmídicos cotransfectados	50
4.8.3.	Activador utilizado	52
4.8.4.	Electroporación	54
4.8.5.	Ensayos de actividad luciferasa	54
4.8.6.	Ensayos con β -galactosidasa.....	55
4.8.7.	Normalización de los datos	55
5.	Resultados	57
5.1.	Caracterización genética de la región LTR	58
5.2	Cambios genéticos de la región LTR en distintas variantes del VIH-1	64
5.2.1.	Patrones de secuencia específicos de subtipo.....	68
5.2.2.	Presencia de la región polimórfica MFNLP en los diferentes subtipos del VIH-1.....	71
5.3.	Variabilidad genética intrasubtipo de la región LTR	73
5.4.	Variabilidad genética de la región LTR en los pacientes con progresión lenta de la enfermedad.....	74
5.5.	Funcionalidad de los diferentes promotores LTRs de las distintas variantes del VIH-1 en células Jurkat.....	77
5.6.	Actividad basal e inducida por PMA en los promotores LTR de las distintas variantes del VIH-1	80
5.7.	Actividad inducida por Tat en los promotores LTR de las distintas variantes del VIH-1	83
5.8.	Actividad transcripcional de los promotores LTR hipermutados	86
6.	Discusión.....	91
6.1	Clasificación de las diferentes variantes del VIH-1 mediante análisis filogenético de la región LTR	93
6.2.	Recombinación entre las regiones LTR y PR.....	94
6.3	Variaciones genéticas específicas de subtipo en la región LTR.....	95

6.4.	Frecuencia de mutante en los sitios Sp1 (I y II) en virus de pacientes progresores lentos.....	96
6.5.	Actividad transcripcional “ <i>in vitro</i> ” en los promotores LTR de diferentes variantes del VIH-1.....	98
6.5.1.	Basal.....	99
6.5.2.	Inducida por PMA.....	100
6.5.3.	Inducida por Tat.....	102
6.6.	Actividad transcripcional “ <i>in vitro</i> ” de los promotores LTR hipermutados	103
7.	Conclusiones	105
8.	Bibliografía	108
9.	Anexos.....	126
	Anexo 1: Patrón de recombinación del genoma completo de las variantes CRF01_AE, CRF02_AG, CRF04_cpx, CRF06_cpx y CRF11_cpx.....	127
	Anexo 2: Publicaciones surgidas de esta Tesis ·	129
10.	Abreviaturas.....	132

1. Resumen en inglés

Transcriptional activation of HIV-1 gene expression is partially controlled by the interaction of viral and cellular transcription factors with the HIV-1 long terminal repeat (LTR) sequences. The TAR sequence located in the LTR plays a critical role in HIV mRNA elongation driven by the viral Tat protein. Previous studies have suggested that LTR specific sequence variability among different HIV-1 variants could affect their transcriptional activity and may have consequences in the replication efficiency of a given HIV-1 subtype. However, the relation between subtype, biological properties and pathogenicity remains unclear for the majority of HIV-1 clades and results are controversial. We have characterized the HIV-1 LTR region from clinical samples in subjects infected with the majority of HIV-1 group M subtypes (A, B, C, D, F, G and H) and recombinant forms CRF01_AE and CRF11_cpx. Furthermore, we have analysed their functional activity in response to Tat expression and cell activation. Some LTR representative sequences from each HIV-1 variant were cloned in luciferase expression vectors and transfected in the Jurkat-cell line. Both basal and Tat-induced transcriptional activities are determined in the presence and absence of PMA stimulation. Transcription assays showed that LTR from all HIV-1 variants were functional promoters with a low basal transcriptional activity, which was strongly induced by both HIV-1 Tat and PMA stimulation. A synergistic effect between the Tat viral protein and cellular activation was observed. This is one of the largest studies analyzing LTR transcriptional activities in a wide spectrum of HIV-1 variants.

2. Introducción

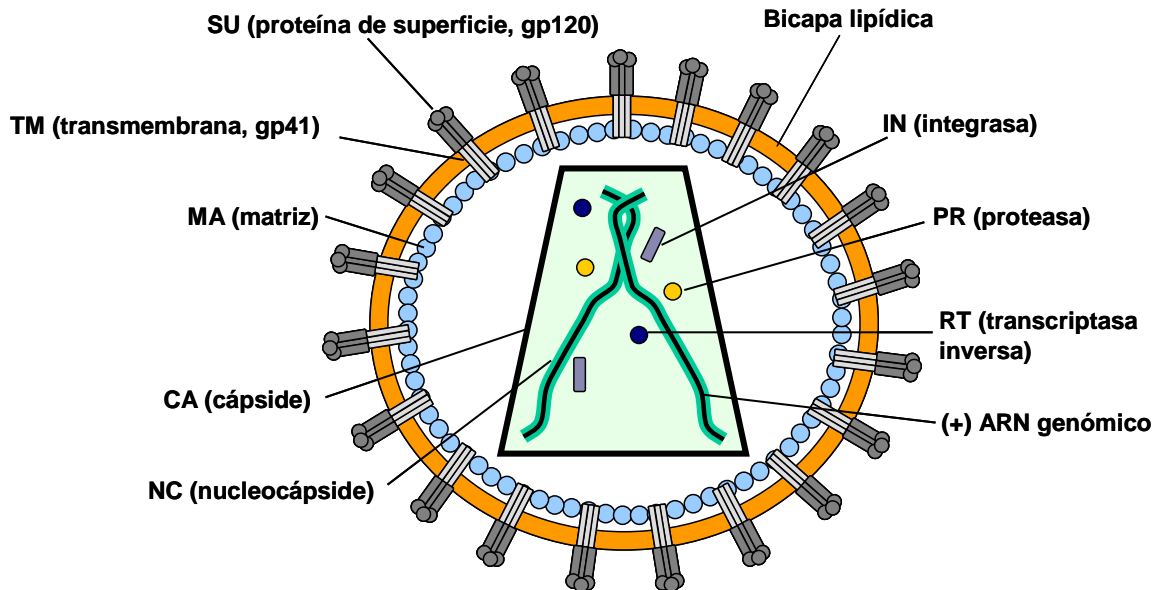
2.1. Estructura del VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en humanos. Es un virus ARN clasificado dentro de la familia *Retroviridae* perteneciente al género *Lentivirus* (Barré-Sinoussi et al., 1983).

La estructura y organización genómica del VIH se muestran en la Figura 2.1. El VIH está constituido por una envuelta externa (bicapa lipídica) en la cual se insertan la glicoproteína de superficie gp120 (SU) y la proteína transmembrana gp41 (TM). En el interior del virus se encuentra la cápside formada por las proteínas de la matriz (MA, p17), cápside (CA, p24) y nucleocápside (NC, p7). Dentro de la cápside viral, se localiza el material genético del virus constituido por dos cadenas sencillas de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 9,8 kb asociadas a las proteínas de la nucleocápside, los enzimas esenciales para la replicación del virus como son la transcriptasa inversa (RT), proteasa (PR) e integrasa (IN) y las proteínas reguladoras (Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr, Vpu, Vpx) (Emerman et al., 1998; Seelamgari et al., 2004).

En ambos extremos del genoma ARN se encuentra la secuencia repetida R de aproximadamente 100 nucleótidos. A continuación, en dirección 5'-3', se encuentra la región única no codificante (U5), que es la primera en transcribirse y que formará el extremo 3' del provirus (virus integrado en la célula huésped). Junto a ella, se localiza la región de unión al primer ARNt específico (PBS), la región Leader, los genes que codifican para las proteínas del virus, la cola de polipurinas, y por último la región U3 que formará, junto con la región R, el extremo 5' del provirus.

A)



B)

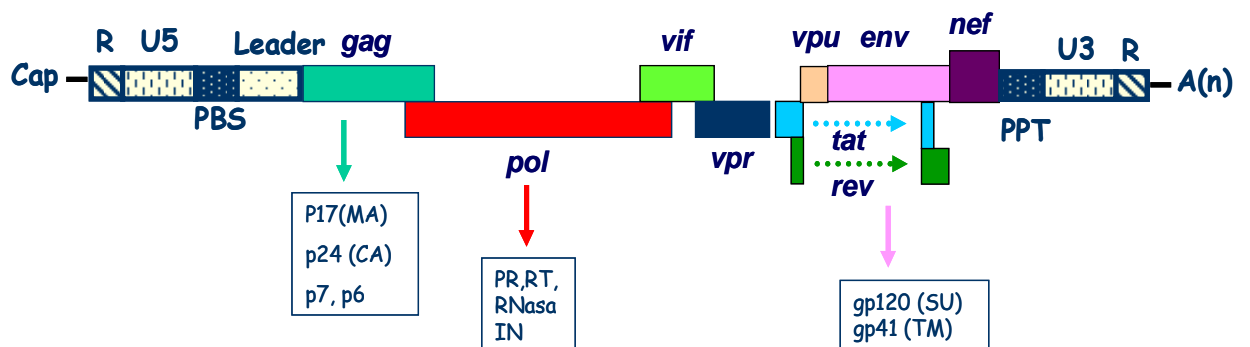


Figura 2.1. Esquema de la estructura del VIH (A) y de la organización genómica de su ARN (B).

En la tabla 2.1 se muestran los diferentes genes que van a codificar para las distintas proteínas del virus, así como su localización y función.

Tabla 2.1 Genes y proteínas del VIH.

Gen	Proteína	Función
<i>gag</i>	p24 (CA)	Proteína estructural que forma la cápside
	p17 (MA)	Proteína estructural que forma la matriz
	p7 (NC)	Proteína estructural que forma la nucleocápside
<i>pol</i>	PR	Enzima proteasa. Implicada en la maduración del virión.
	RT	Enzima transcriptasa inversa. Cataliza el paso de ARN a ADN.
	IN	Enzima integrasa. Implicada en la integración del ADNds (ADN proviral) sintetizado en el genoma del huésped.
<i>env</i>	gp120 (SU)	Proteína estructural que forma la envuelta. Se une al receptor CD4.
	gp41 (TM)	Proteína estructural que forma la envuelta. Implicada en la fusión de membranas.
<i>tat</i>	Tat	Factor viral de transactivación transcripcional. Proteína reguladora esencial para la replicación del virus. Actúa uniéndose a la región TAR del genoma.
<i>rev</i>	Rev	Segunda proteína reguladora esencial para el virus. Es una fosfoproteína que se une a RER y promueve el transporte y estabilización del ARNm entre núcleo y citoplasma.
<i>nef</i>	Nef	Regulador negativo de la presencia del receptor CD4 y moléculas MHC de clase I en la membrana celular.
<i>vif</i>	Vif	Factor de infectividad viral. Inhibe la acción antiviral de proteínas celulares (CEM15) sobre el ARN viral.
<i>vpr</i>	Vpr	Proteína implicada en el transporte de complejos de preintegración, transactivación de genes celulares, parada del ciclo celular.
<i>vpu</i>	Vpu	Proteína única al VIH-1 implicada en la degradación de CD4 en el retículo endoplasmático y liberación de viriones.
<i>vpx</i>	Vpx	Proteína homóloga a Vpr presente solo en VIH-2.

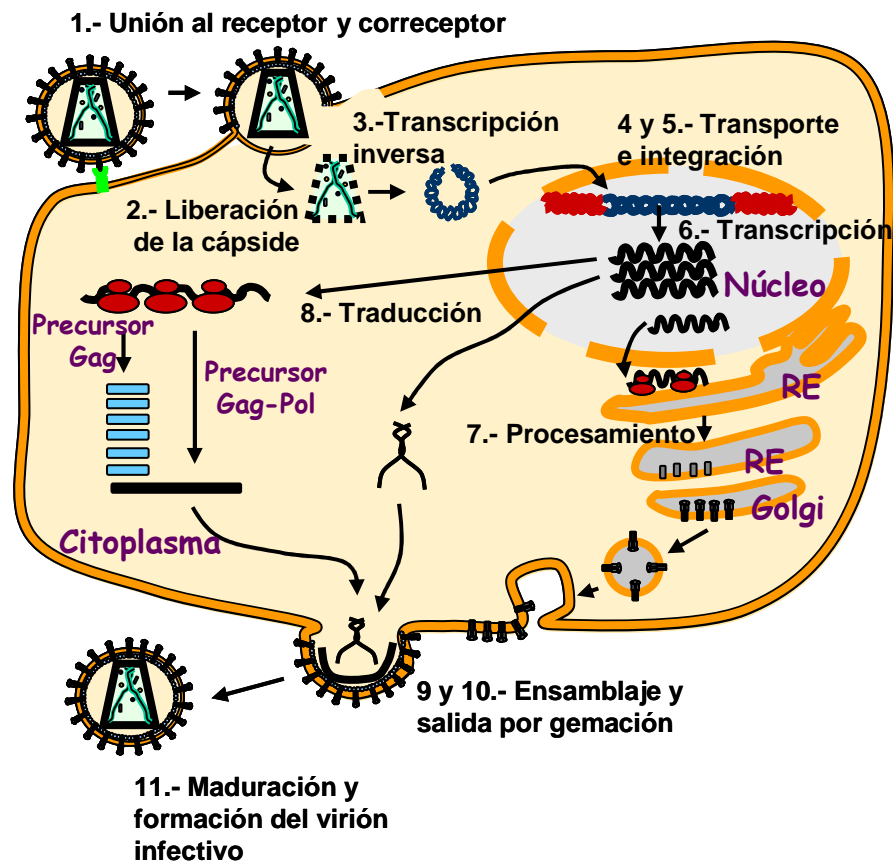
2.2. Ciclo replicativo del VIH

La replicación del VIH se puede dividir en las siguientes etapas: 1) entrada del virus en la célula huésped por la unión de la glicoproteína gp120 con el receptor CD4+ y con el correceptor de quimioquinas CCR5 o CXCR4 de los linfocitos T, mayoritariamente; 2) liberación al citoplasma de la cápside viral; 3) transcripción en reverso del ARN genómico viral y formación del ADN complementario de doble cadena mediado por la transcriptasa inversa; 4) transporte del ADN al núcleo celular; 5) integración en el genoma de la célula hospedadora mediante las secuencias LTR, por la acción de la integrasa; 6) transcripción de los genes provirales utilizando tanto factores celulares como virales que se van a unir a la región LTR presente en ambos extremos del provirus integrado; 7) procesamiento de los transcritos primarios hasta ARN genómico viral y ARNm viral; 8) traducción de los ARNms a las distintas proteínas virales en el citoplasma; 9) ensamblaje de las proteínas virales, 10) salida del virión por gemación, arrastrando parte de la membrana de la célula huésped; 11) maduración por medio de la acción de la proteasa viral que corta las poliproteínas precursoras para formar el virión infectivo (Figura 2.2) (Levy, 1993).

2.3. Variantes del VIH

La gran heterogeneidad genética del VIH es debido fundamentalmente a la elevada tasa de mutación, con la aparición de 1 a 10 cambios de media en cada cadena de ARN por ciclo replicativo. Ello es debido a que la ADN polimerasa viral carece de la actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores que elimina los nucleótidos incorporados incorrectamente. Por ello, las poblaciones del VIH replican

como distribuciones complejas de genomas diferentes, pero genéticamente relacionados, llamadas “*cuasiespecies*”. Además la variación genética en el VIH puede ocurrir por adiciones o deleciones de nucleótidos y por procesos de recombinación (Peeters, 2000).



RE, retículo endoplasmático.

Figura 2.2 Ciclo replicativo del VIH-1.

Se han identificado 2 tipos del VIH que infectan a humanos: VIH-1 y VIH-2. Las variantes del VIH-1 son las más extendidas y producen la mayor parte de los casos de infección en todo el mundo (Thomson et al., 2005). Sin embargo, el número de

casos de infección por VIH-2 es mucho menor y su distribución geográfica está confinada básicamente en África Occidental (McCutchan, 2006). Además, difieren en su historia natural y características biológicas, ya que el VIH-2 es más cercano filogenéticamente al virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) y parece ser menos patogénico y transmisible que el VIH-1 (Azevedo-Pereira et al., 2005).

Dentro del VIH-1 se han diferenciado, por orden cronológico, tres grandes grupos en base a los análisis filogenéticos de las regiones *gag*, *env* y *pol*: M (main o principal), O (outlier) y N (no M, no O). Las variantes englobadas en el grupo M, a su vez, se han dividido en base a su homología genética en 9 subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J y K), 34 formas recombinantes (CRFs, *circulant recombinant forms*: <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/CRFs/CRFs.html>) hasta el momento y múltiples formas recombinantes únicas (URFs) (Tabla 2.2). Las variantes que se englobaron hace unos años como subtipo E, han resultado ser recombinantes entre los subtipos A y E, incluyéndose actualmente en la forma recombinante CRF01_AE (Gao et al., 1996). Además, dentro de algunos subtipos se han distinguido sub-subtipos. Por ejemplo, los sub-subtipos A1 y A2 se engloban dentro del subtipo A (Gao et al., 2001) y los sub-subtipos F1 y F2 dentro del F (Tabla 2.2). La distribución geográfica de las variantes del grupo M es muy amplia y están extendidas por todo el mundo. Esto es debido fundamentalmente a la gran movilidad de la población, favorecida por el turismo y la emigración (Holguín et al., 2003). Sin embargo, los grupos O y N presentan una baja prevalencia, siendo mayoritarios en África occidental.

2.3.1. Implicaciones clínicas y biológicas de la variabilidad genética del VIH-1

La enorme variabilidad genética del VIH-1 puede tener relevancia biológica en cuanto a su patogenicidad, transmisibilidad, diagnóstico y diseño de vacunas (Geretti, 2006). Aunque algunos trabajos han sugerido diferencias biológicas entre ciertas variantes, se necesitan más estudios para ser clarificadas. Así, recientemente se ha publicado que los pacientes infectados por cepas del subtipo D del VIH-1 progresan más rápidamente a SIDA y mueren antes que aquellos infectados por subtipos A del VIH-1 (Baeten et al., 2007). También se ha visto que podrían existir diferencias en el uso de quimiorreceptores por parte de distintos subtipos (Tscherning et al., 1998), falsos negativos en diagnósticos por PCR de algunas cepas no-B y recombinantes del VIH-1, valores de carga viral erróneos (Holguín et al., 1999) o falsos negativos por el fallo de las técnicas de cuantificación en ciertas variantes virales. Incluso podrían existir diferentes susceptibilidades a algunos fármacos *in vitro* de ciertos aislados, debido a la presencia de polimorfismos naturales en determinadas posiciones (algunas de ellas asociadas a resistencia a fármacos) de la proteasa y retrotranscriptasa, proteínas virales dianas de los principales fármacos antirretrovirales en uso terapéutico (Holguín et al., 2004). Incluso se está estudiando si la respuesta clínica a los distintos fármacos antirretrovirales depende de la variante del VIH-1 que infecta (Holguín et al., 2006). Sin embargo, los estudios al respecto son escasos y los resultados publicados controvertidos. Por último, se ha visto que variaciones genéticas del promotor LTR podrían producir diferencias en la actividad transcripcional *in vitro* de los genes del VIH-1 en las diferentes variantes, como se estudiará más adelante.

Tabla 2. 2. Clasificación de las variantes del VIH.

Tipo	Grupo	Subtipos y recombinantes (CRF/URF)
HIV-1	M	9 subtipos (A,B,C,D,F,G,H,J,K) sub-subtipos A1 y A2 (subtipo A) sub-subtipos F1 y F2 (subtipo F)
		34 CRF ¹ : 01 (A,E) 02 (A,G) 03 (A,B) 04 (A,G,H,K,U) 05 (D,F) 06 (A,G,J,K) 07 (B,C) 08 (B,C) 09 (CRF02/A/U) 10 (C,D) 11 (A,CRF01,G,J) 12 (B,F) 13 (A,CRF01,G,J,U) 14 (B,G) 15 (CRF01,B) 16 (A2,D) 17 (B,F1) 18 (A1,F,G,H,K,U) 19 (A1,D,G) 20 (B,G) 21 (A2,D) 22 (CRF01,A1) 23 (B/G) 24 (B,G) 25 (A/G/U) 26 (A,U) 27 (no publicado) 28 (B/F) 29 (B,F) 30 (no publicado) 31 (B/C) 32 (CRF06,A1) 33 (CRF01/B) 34 (CRF01/B)
		Múltiples URF ²
	O	5 (I, II, III, IV, V)
	N	--
HIV-2	--	8 (A-H)

¹CRF, Formas recombinantes circulantes (<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/CRFs/CRFs.html>)²URF, Formas recombinantes únicas

2.4. Estructura y función del LTR

Las secuencias terminales largas repetidas (Long Terminal Repeats, LTR) del VIH-1 presentes en ambos extremos del genoma viral, están implicadas en la retrotranscripción, integración, transcripción y regulación de la expresión génica. En este último sentido, podemos decir que el LTR viral es similar a un promotor eucariótico complejo, que se encuentra dividido en varias regiones. Así, el LTR del ARN viral presenta la región R-U5 en el extremo 5' y U3-R en el extremo 3'. Por el contrario, la duplicación de las secuencias que se produce en el proceso de retrotranscripción hace que las dos LTRs en el ADN proviral sean idénticas, presentando 3 regiones funcionales en ambos extremos: U3-R-U5 (Figura 2.3).

La región U3 situada en el extremo 5' de la forma proviral del VIH (posiciones -454 a -1) no es una región codificante, sino estrictamente reguladora que dirigirá la transcripción viral. Se subdivide, a su vez, en tres regiones: promotora, potenciadora ("enhancer") y moduladora. La región promotora es imprescindible para la transcripción basal de los genes virales. Contiene la secuencia de iniciación de la transcripción (TATAA) y los sitios consenso Sp1, a los cuales se une la proteína Sp1 para ayudar a la activación de la transcripción viral. Adyacente a esta zona, se encuentra la región potenciadora, cuya función es la transcripción inducible de los genes virales. Esta presenta el sitio de unión para NF- κ B, el cual actúa en respuesta a señales celulares y a estímulos inmunológicos. Por último, la región moduladora se encarga de incrementar o inhibir la transcripción. Para ello, esta región contiene múltiples secuencias que sirven como sitios de unión de diversas proteínas celulares que modulan la transcripción viral (Pereira et al., 1999) (Figura 2.3).

La región R (posiciones +1 a +100) se transcribe y forma el ARN llamado TAR, el cual conforma una estructura terciaria a la que se une la proteína viral Tat. Esta proteína estabiliza los complejos de iniciación y de elongación transcripcional (Figura 2.4). Además, dicha región presenta sitios de unión para factores celulares (por ejemplo Ap-1) que modulan la transcripción (Pereira et al., 1999) (Figura 2.3).

Las regiones U5 (+100 a +181) y GLS (*Gag* Leader Sequence) (+181 a +292) se encuentran distales al sitio de iniciación de la transcripción. Sin embargo, se ha descrito la presencia de secuencias consenso para diferentes factores de transcripción que parecen jugar un papel en la regulación de la transcripción del VIH-1, como Ap-1, Ap3-L/NF-AT, DBF/IRF y Sp1 (El Kharroubi et al., 1996; Van Lint et al., 1997; Battistini et al., 2002) (Figura 2.3).

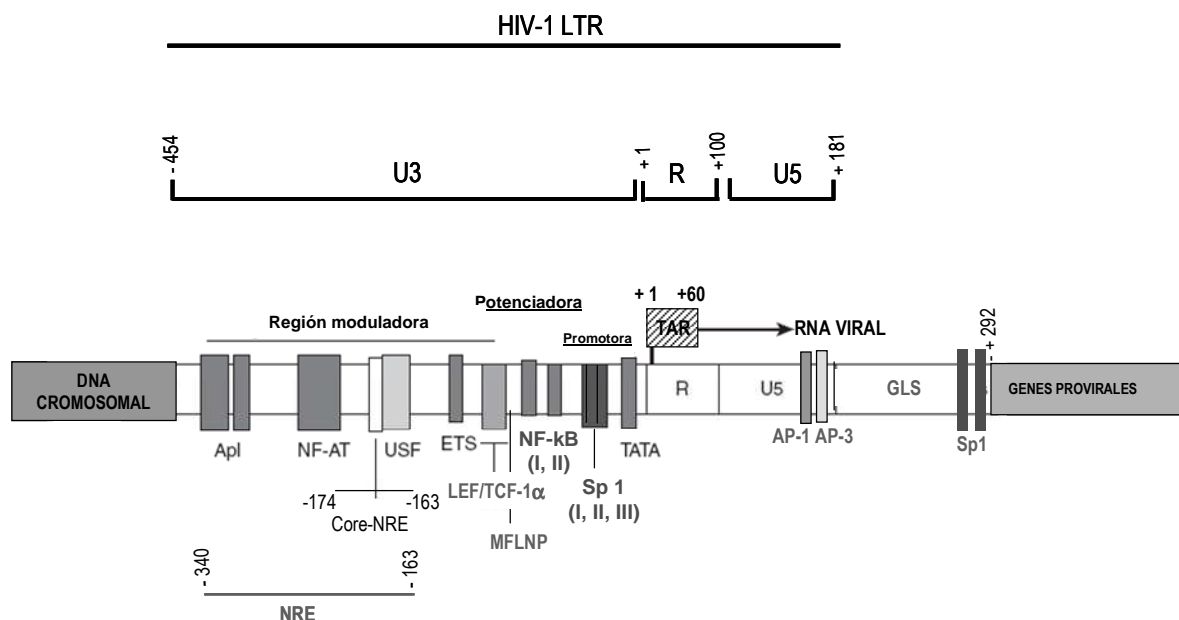


Figura 2.3. Estructura del LTR en el VIH-1 y secuencia "leader" gag (GLS). Se indican las posiciones que comprende cada región, así como los factores celulares de unión a cada una de ellas. Numeración con respecto al aislado de referencia HXB2 del VIH-1.

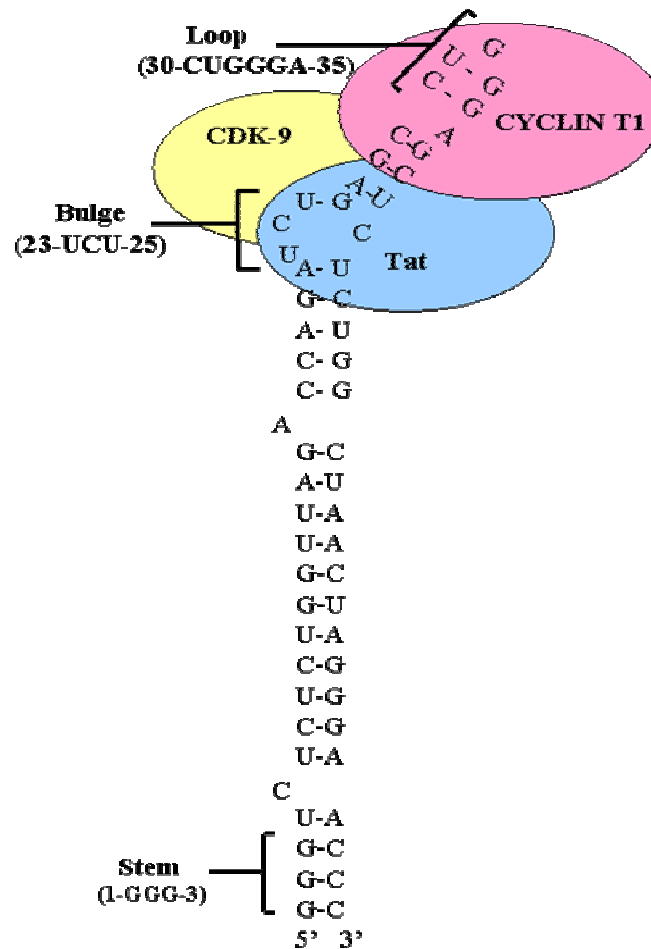


Figura 2.4. Esquema de la estructura de TAR y sitios de unión de la proteína viral Tat (Bulge) y las proteínas celulares quinasa CDK-9 y ciclina T1 (Loop) necesarias en la activación de la transcripción viral.

2.5. Mecanismo de transcripción de los genes del VIH

El material genético del VIH-1, al integrarse en el genoma de la célula hospedadora, se comporta como un gen celular inducible (estado de latencia/reactivación) dependiente de la inducción de señales de activación celular que van a producir la transcripción de sus genes. La regulación de dicho proceso se va a producir a través de varios niveles. El primer nivel se produce por la interacción

entre la caja TATA clásica situada en el LTR del VIH-1 y la maquinaria transcripcional basal o inicial de la célula hospedadora, la cual está constituida por proteínas celulares de unión al promotor necesarias para el inicio de la transcripción viral. Este proceso implica, por una parte, modificar la estructura del nucleosoma (complejo histonas-ADN) para permitir el acceso al ADN viral y, por otra, la unión de la caja TATA con una serie de factores activadores y adaptadores [Tata Binding Protein (TBP), p300, TAFs, etc], que permitirán el reclutamiento de la ARN polimerasa II al sitio de inicio de la transcripción (Figura 2.5).

En un segundo nivel actúan los factores de transcripción que se unen a las secuencias potenciadoras (“enhancer”) y reguladoras, que activan la transcripción mediante la “transactivación” del LTR viral. Distintas señales intra e intercelulares activan una serie de vías metabólicas que movilizan distintos factores de transcripción o los translocan al núcleo celular, donde se unen a sus consensos en el LTR, induciendo así la transactivación del mismo. De esa manera se produce el “inicio de la transcripción” mediante la acción de factores que actúan sobre la región reguladora y las proteínas de la maquinaria transcripcional basal que se unen a la caja TATA (Figura 2.5). Sin embargo, en el caso del VIH-1, la potencia transcripcional de estos factores es limitada y no se consigue una elongación completa de ARNm viral. Para ello es necesario un tercer nivel de regulación en el que la proteína viral Tat se une al ARN “naciente” de la región TAR del LTR y recluta el complejo P-TEFb (Ciclina T1/kinasa CDK9) al complejo transcripcional (Figura 2.4) (Bieniasz et al., 1999). El factor CDK9 permite la fosforilación de la unidad C-terminal (CTD) de la ARN polimerasa II, aumentando su actividad y procesividad, lo que permite la elongación completa del genoma del VIH y el mantenimiento de altos

niveles de expresión génica viral (Figura 2.6). Estos tres procesos no deben considerarse compartimentos estancos, ya que los distintos factores interaccionan entre sí. Así Sp1 interacciona con la proteína p300 del complejo transcripcional primario y la proteína viral Tat con los factores Sp1 y NF- κ B (Alcamí et al., 1995). La acción de los distintos factores debe contemplarse como un proceso sinérgico que permite, finalmente, la transcripción del genoma viral.

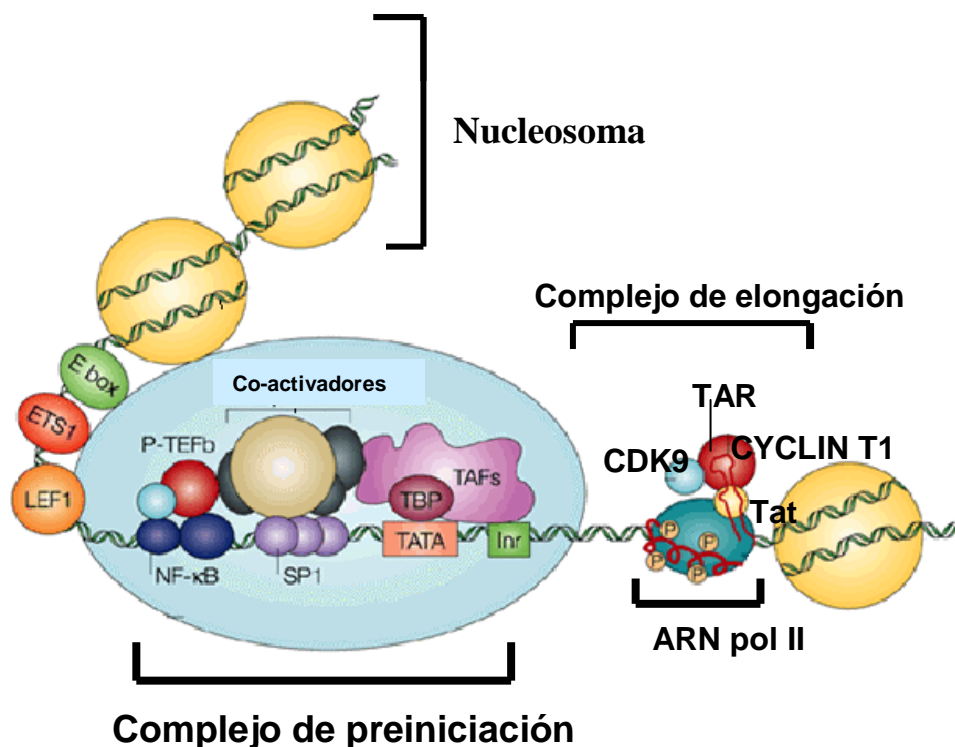


Figura 2.5. Complejos de iniciación y elongación necesarios para la actividad transcripcional del promotor LTR del VIH (modificado de Peterlin M, Nature Reviews Immunology 2003).

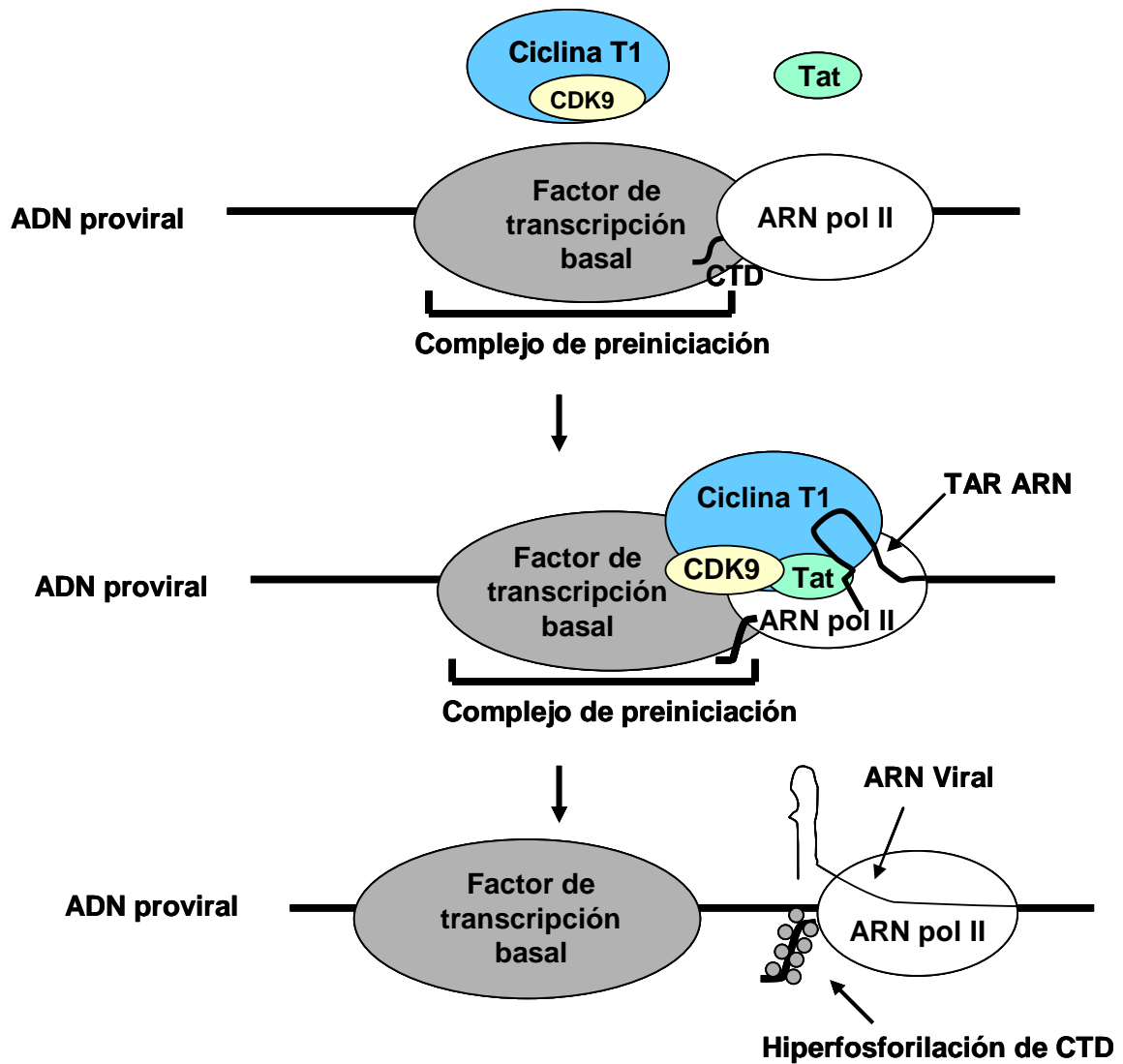


Figura 2.6. Esquema del mecanismo de elongación transcripcional mediado por la proteína viral Tat.

2.6. Factores de unión a la región LTR del VIH-1

La importancia del estudio de la estructura y función de las proteínas celulares y virales de unión a la región LTR radica en que modulan la regulación de la transcripción del VIH-1. Las proteínas moduladoras más estudiadas que se unen a la región LTR, regulando la expresión génica del VIH-1 (Pereira et al., 1999), se resumen en la Figura 2.3 y son:

2.6.1. Factores celulares

Factor Sp1 (proteína específica 1): Pertenece a la familia de proteínas ubicuas de unión a cajas GC (ricas en guaninas y citosinas) mediante dominios en forma de dedos de Zinc presentes en muchos promotores celulares y virales. Están implicadas en la activación de la transcripción viral tanto basal como dependiente de Tat (Jones et al., 1986; Harrich et al., 1989). Se ha visto que determinadas deleciones y mutaciones en las secuencias Sp1 del LTR pueden disminuir su actividad (Kirchhoff et al., 1997; Fang et al., 2001). Además, para actuar necesita interaccionar con otros factores celulares como NF- κ B (Perkins et al., 1993).

Factor NF- κ B (factor nuclear Kappa B): Pertenece a una familia de proteínas que activan la transcripción viral en respuesta a mitógenos, citoquinas y estímulos inmunológicos. Nabel y Baltimore demostraron mediante ensayos *in vitro* que mutaciones en el motivo NF- κ B del LTR disminuyen la expresión génica viral (Nabel

et al., 1987). Además, se conoce que NF- κ B es un activador de genes implicados en inflamación y apoptosis. Por ello, se están diseñado compuestos anti-inflamatorios e inmunosupresores que inhiban su actividad (Pande et al., 2003). Por el contrario, otros compuestos como la prostratina son capaces de activar NF- κ B, pudiendo favorecer de esa manera la activación de los reservorios latentes y disminuyendo así, la carga proviral en el individuo (Rullas et al., 2004).

Factor Ap-1 (Proteína Activadora). El factor nuclear de transcripción AP-1 es una proteína dimérica, formada por homodímeros entre miembros de la familia Jun, o heterodímeros entre miembros de las familias Jun y Fos, regulada a través de la vía de señalización de las MAP quinasas (Mitogen-activated protein) (Chang et al., 2001) . Se ha visto que su interacción cooperativa con el factor NF- κ B produce la activación sinérgica del LTR del VIH-1 (Yang et al., 1999).

Factores RBF-1 y RBF-2 (factores de unión de respuesta a Ras). Son factores celulares de respuesta a Ras, proteína anclada a la superficie interna de la membrana con actividad GTPasa y que produce la propagación de señales celulares mediante la activación de una cascada de quinasas. Se unen a los elementos de respuesta a Ras (RBE I, II, III y IV) presentes en el LTR, que están muy conservados entre los diferentes subtipos (Estable et al., 1999). Mutaciones en las regiones RBEs impiden la estimulación del LTR en respuesta a Ras (Bell et al., 1996). Algunos autores defienden que el factor RBF-2 además, se une a la región polimórfica MFNLP presente en U3 del LTR, reprimiendo la transcripción del VIH-1 en células T activadas y monocitos (Estable et al., 1998).

NF-AT (factor nuclear de células T activadas). Es un miembro de la familia de factores nucleares de activación de células T entre los que se encuentran NF-AT1 y NF-AT2. Estos factores se encuentran en estado inactivo en el citoplasma y se activan en el núcleo, donde realiza su función al unirse a su sitio específico del LTR. En cuanto a la función de ambas, parece que ejercen efectos contrarios. Se ha visto que NF-AT2 produce la activación de la transcripción en células T y que existe una cooperación entre dicho factor y NF- κ B para transactivar la LTR (Kinoshita et al., 1997). Sin embargo, ensayos *in vitro* con células Jurkat han demostrado que el factor NF-AT1 puede competir por el sitio de unión de NF- κ B en la región LTR, produciendo un efecto inhibitorio sobre la transcripción (Macian et al., 1999).

Ets (erythroblastoma twenty-six). Es una familia multigénica de proteínas (Ets-1, Ets-2 y Elf-1) que juegan un papel importante en la regulación de la expresión del VIH-1 y VIH-2 en células T. Así, se han identificado dos sitios de unión para Ets en las regiones “potenciadora” y moduladora del LTR. Estudios *in vitro* con células T demostraron que la interacción entre múltiples proteínas Ets y miembros de la familia NF- κ B/NF-AT era necesaria para la expresión de múltiples genes virales (Bassuk et al., 1997). Además, parece que la unión cooperativa entre Ets y el factor USF-1 activa sinérgicamente la transcripción del VIH-1 (Sieweke et al., 1998).

USF (factor estimulador upstreams). Es un miembro de la familia de factores de transcripción que se expresa de manera constitutiva en algunos tejidos. Fue caracterizado como un activador positivo del promotor en adenovirus (Sawadogo et al., 1985; Gregor et al., 1990). Sin embargo, su función en la infección por VIH-1 no está clara. USF activa la transcripción en células T, pero la reprime en células

epiteliales, con independencia del subtipo genético viral (Naghavi et al., 2001). El sitio de unión de USF es un motivo llamado E-box [CAC(A/G)TG], situado dentro de la región del core-NRE de la LTR de los subtipos B y C, pero no se une al core-NRE de los subtipos A, D, E (CRF01_AE) o G (Naghavi et al., 2001). Sin embargo, se ha visto que la presencia del factor afecta a la transcripción de todos los subtipos, sugiriendo que USF actuaría en dichas variantes, a través de la unión con otra secuencia del LTR no identificada hasta la fecha (Naghavi et al., 2001).

2.6.2. Factores virales

La proteína *Tat* (*Trans-activator of transcription*) es una proteína que se expresa en la fase temprana de la transcripción del VIH-1. El gen *Tat* está compuesto por 2 exones, que darán lugar a una proteína de 101 aminoácidos. El exón 1 presenta el sitio de unión a la región TAR del LTR, una región rica en arginina necesaria para su entrada al núcleo que es donde *Tat* actúa (García et al., 1988; Modesti et al., 1991) y la región activadora de unión al complejo proteico P-TEFb. La proteína viral *Tat* es un activador muy potente de la expresión del VIH-1 y aumenta la procesividad de la ARN polimerasa II (Gaynor, 1995). Ello favorece la elongación completa del ARN viral y la consecuente expresión de los genes de la fase tardía, manteniendo así altos niveles de producción viral. *Tat* actúa estimulando las quinasas celulares que, a su vez, estimulan la eficiencia de la ARN polimerasa II celular en los pasos iniciales de la elongación de la transcripción (García-Martínez et al., 1997; Cullen, 1998) (Figura 2.6). Para ello se requiere la presencia de los factores celulares Sp1 y NF- κ B y la asociación con varios coactivadores (Alcamí et al., 1995; Rohr et al., 2003).

2.7. Variabilidad genética del LTR en los distintos subtipos del VIH-1

Estudios anteriores demostraron mediante mutagénesis que cambios en las secuencias de unión de los factores celulares y virales necesarios en el inicio y elongación de la transcripción, tanto de manera individual como colectiva, producían una inhibición de la replicación del VIH-1 (Jones et al., 1986; García et al., 1987; Harrich et al., 1989; Koken et al., 1992; Gaynor, 1992; Michael et al., 1994). Se han descrito cambios genéticos específicos de subtipo en determinadas zonas reguladoras, del core, y potenciadora del LTR que se detallan a continuación (Tabla 2.3). Dichas diferencias genéticas observadas en los distintos subtipos del grupo M del VIH-1 podría afectar a los niveles de transcripción viral (Montano et al., 1997; Montano et al., 1998; Naghavi et al., 1999; Jeeninga et al., 2000; Ramírez de Arellano et al., 2006b)

2.7.1. Variabilidad intersubtipo en la región U3

Todos los subtipos del VIH-1 presentan la caja funcional TATAA (localizada en la posición -28), encargada de unir las proteínas TBP (Figura 2.5) y reclutar la ARN pol II, excepto en el recombinante CRF01_AE, en el subtipo J y en el 12% de las muestras con subtipo G en LTR. En dichas variantes, la caja TATA presenta una mutación, de forma que la secuencia cambia a TAAAA (Montano et al., 1997; Montano et al., 1998; Jeeninga et al., 2000; Ramírez de Arellano et al., 2005).

Todos los subtipos del VIH-1 grupo M presentan 3 sitios Sp1 (I, II y III) con una alta variabilidad intersubtipo, siendo el sitio Sp1 III el más variable (Montano et al., 1997; Naghavi et al., 1999; Jeeninga et al., 2000; Roof et al., 2002; Lospitao et al., 2003; Ramírez de Arellano et al., 2005). En algunos aislados virales con subtipo B se ha encontrado un cuarto sitio Sp1 (IV), entre Sp1 I y Sp1 II (Koken et al., 1992; Michael et al., 1994). Su presencia no ha sido reconocida hasta ahora en subtipos no-B del VIH-1.

Asimismo, existen variaciones en el número de sitios NF- κ B en la región “potenciadora” de U3 al comparar los diferentes subtipos (Tabla 2.3). El promotor LTR del subtipo C contiene 3 sitios NF- κ B, el recombinante CRF01_AE un solo sitio NF- κ B (Verhoef et al., 1999), y el resto de subtipos presentan 2 sitios funcionales.

El número de sitios AP-1 también varía dependiendo del subtipo (Jeeninga et al., 2000). Según trabajos previos, parece que está ausente en el subtipo B y D, mientras que el promotor de los subtipos F y A presenta 2 sitios de unión y en el resto de subtipos sólo 1 sitio (Jeeninga et al., 2000) (Tabla 2.3).

Se han descrito secuencias específicas de subtipo en ciertos sitios de unión a factores celulares en la región moduladora de U3 de la LTR. Es el caso de la secuencia Core-NRE (posiciones -174 a -163, Figura 2.3), que tiene un patrón de secuencia específico en las variantes C, D, J y CRF01_AE (Tabla 2.3) (Naghavi et al., 1999; Ramírez de Arellano et al., 2005).

Tabla 2.3. Diferencias en las secuencias LTR en distintas variantes del VIH-1.

Variantes del VIH-1									
	A	B	C	D	CRF01_AE	F	G	H	J
Caja TATAA (posición -28)	Sí	Sí	Sí	Sí	No (TAAAA)	Sí	Sí	Sí	No (TAAAA)
Número de sitios Sp1	3	3 ^a	3	3	3	3	3	3	3
Número de sitios NF-κB	2	2	3	2	1	2	2	3	3
Número de sitios AP-1	2	0	1	0	1	2	1	nd	nd
Interacción del sitio USF con el Core- NRE	No	Sí	Sí	No	No	nd	No	nd	nd
Secuencia específica de la región NRE	No	No	CGCA(Pu)ACACATC	TTTGAAYCAAAG	CGAAAACACATA	No	No	No	CGAAGACACATA
Variación de la secuencia TAR	1 nucleótido delecionado (U25Δ)	No	C24T	C24T	1 nucleótido delecionado (ΔU25)	A22G C24T T31C	C24T	No	T31C

^a Algunas cepas del subtipo B presentan 4 sitios Sp1 en la región del promotor.
nd: no determinado.

Justo antes del sitio NF- κ B en la posición -120 de U3, existe una región polimórfica denominada MFNLP (most frequent naturally length polymorphism) (Figura 2.3), que presenta inserciones de longitud variable (de 15 a 34 pares de bases) en la mayoría de los subtipos del VIH-1, excepto en el recombinante CRF01_AE (Ramírez de Arellano et al., 2005). En un principio, esas inserciones se denominaron “motivos CTG” (Koken et al., 1994). Con posterioridad se ha sugerido que corresponden a una duplicación parcial o total del sitio de unión al factor celular TCF α (Zhang et al., 1997b). Más recientemente, se ha postulado que este polimorfismo natural representa un sitio RBE III de unión para el factor celular RBF-2 (Estable et al., 1998).

2.7.2. Variabilidad intersubtipo en la región R

En la región R, la secuencia TAR (a cuyo ARN se une la proteína viral transactivadora Tat) también presenta diferencias específicas de subtipo. Así, se ha visto que el subtipo A y el recombinante CRF01_AE presentan en su secuencia TAR un nucleótido deletado (Δ U25), lo que podría modificar la estructura secundaria del ARN viral. Además, algunas variantes CRF01_AE presentan mutaciones (A22G y T31C) en dicha región (Montano et al., 1997; Montano et al., 1998) (Tabla 2.3)

2.7.3. Variabilidad intersubtipo en la región U5

La variabilidad genética de la región U5 del LTR viral no ha sido estudiada aún en los distintos subtipos del VIH-1, a pesar de incluir sitios de unión a factores celulares relacionados con regulación de la transcripción viral (Van Lint et al., 1997).

2.8. Actividad del promotor LTR en distintos subtipos del VIH-1

Diversos estudios *in vitro* han demostrado diferencias en los niveles de transcripción de distintos subtipos del VIH-1. Ello podría ser debido a cambios genéticos presentes en la secuencia de las regiones promotora, potenciadora, moduladora y TAR del LTR, ya que podrían afectar a la unión de factores celulares y proteínas virales que regulan la expresión génica del virus. Se ha demostrado que las diferencias encontradas en el grado de replicación viral de diferentes clones infecciosos del VIH-1 con distintas secuencias en sus LTR dependen, tanto del tipo celular utilizado en el ensayo *in vitro*, como del estado de activación celular (Van Opijnen et al., 2004).

Ensayos *in vitro* demuestran que la actividad transcripcional viral del promotor LTR de algunos de los subtipos del VIH-1 analizados es mayor en presencia de la proteína viral Tat respecto al nivel de activación basal cuando Tat está ausente, aunque los resultados son contradictorios. Algunos autores han visto que la actividad transcripcional del LTR de las variantes A, B, C, D, G y CRF01_AE en presencia de

la proteína viral Tat es similar (Naghavi et al., 1999). Sin embargo, otros autores observaron diferencias entre las variantes B, C, Fy CRF01_AE (Montano et al., 1997; Jeeninga et al., 2000).

Además, se han encontrado diferencias en la actividad transcripcional basal e inducida del VIH-1 por algún estímulo celular del promotor de los distintos subtipos en determinados tipos celulares (Montano et al., 1997; Montano et al., 1998; Naghavi et al., 1999; Jeeninga et al., 2000). Así, ensayos *in vitro* con células T (SupT1 y Jurkat T) han mostrado el efecto estimulador del factor TNF- α sobre la actividad transcripcional de las LTRs de distintos subtipos del VIH-1, existiendo una correlación entre el número de sitios NF- κ B y su estimulación con TNF- α . En consecuencia, el promotor LTR del subtipo C con 3 sitios NF- κ B presentó mayor actividad transcripcional basal tras la adición de TNF- α que los subtipos A, B, D, F y G, con sólo 2 sitios NF- κ B. Sin embargo, el recombinante CRF01_AE presentó menor inducción por TNF- α , al tener un sólo sitio NF- κ B funcional (Montano et al., 1998; Jeeninga et al., 2000).

Por otro lado, en algunos estudios observaron diferencias en la capacidad de transactivación de diferentes proteínas virales Tat pertenecientes a las variantes CRF01_AE, C y B del VIH-1, aunque los resultados fueron contradictorios (Roof et al., 2002; Kurosu et al., 2002; Desfosses et al., 2005).

Asimismo, se ha visto que aquellas cepas del subtipo B que poseen 4 sitios de unión al factor Sp1 en la región del promotor del LTR, presentan una ligera mayor

actividad basal transcripcional respecto a aquellas con 3 sitios (Koken et al., 1992; Michael et al., 1994).

El efecto de la presencia de polimorfismos naturales en la región MFNLP de la LTR en variantes del subtipo B es controvertido. Algunos autores proponen que estimulan la actividad transcripcional (Chen et al., 2000), otros que la inhiben (Koken et al., 1992; Koken et al., 1994; Estable et al., 1998) y otros que no producen ningún efecto sobre ella (Estable et al., 1996; Hiebenthal-Millow et al., 2002). Esta disparidad se ha interpretado como resultado del uso de distintas líneas celulares y estímulos en los experimentos *in vitro*. No existen estudios donde se analice el impacto que tendría la presencia de diferentes secuencias polimórficas MFNLP en variantes con subtipos no-B del VIH-1.

Recientemente se han publicado estudios donde se estudia *in vivo* el impacto de determinados polimorfismos genéticos presentes en las LTRs de varios subtipos del VIH-1 sobre la replicación viral. En ellos, se infectaron macacos con quimeras de virus VIS (Virus de la inmunodeficiencia de simio) recombinantes que presentaban las secuencias core, promotor, “potenciadora” y reguladoras del LTR de las variantes B, C y CRF01_AE (Centlivre et al., 2005; Centlivre et al., 2006). Los resultados revelaron que, durante el periodo de primoinfección, la quimera recombinante con la LTR del subtipo C era la variante predominante y mejor adaptada en determinados tejidos celulares.

Tabla 2.4. Estudios previos que analizan la actividad del LTR basal e inducida en diferentes subtipos del VIH-1 *in Vitro*.

Estudios	Región LTR clonada	Subtipos analizados	Estímulo celular	Línea celular	Actividad basal	Actividad inducida por TNF- α	Actividad inducida por Tat
(Montano et al., 1997)	U3/R	B, C, E	nd	Jurkat y 293	C>B>E	nd	Línea: Jurkat: C>E 293: E>C
(Montano et al., 1998)	U3/R	E, B	TNF- α	Jurkat y 293	nd	B>E en ambas líneas celulares	nd
(Naghavi et al., 1999)	U3/R	A, B, C, D, E, G	nd	Hela	C> resto de subtipos	nd	Similar en todos los subtipos
(Jeeninga et al., 2000)	U3/R	A, C, E, F, G	TNF- α	C33A, Hela, COS, U87, U373, SupT1	No-B>B E > resto de subtipos en Sup T1	C>resto de subtipos >E	F>resto de subtipos en COS

nd, no determinado

Subtipo E, actual recombinante CRF01_AE

2.9. Actividad del promotor LTR en pacientes con progresión lenta de la enfermedad

El estudio de la infección por el VIH-1 en pacientes infectados que permanecen asintomáticos durante largo periodo de tiempo (*long-term non-progressors*, LTNP) nos presenta una oportunidad para analizar determinados aspectos patogénicos del virus. Los sujetos LTNP son un grupo heterogéneo de pacientes con cargas virales bajas o indetectables y cifras normales de células CD4+ durante al menos 10 años de enfermedad sin tratamiento antirretroviral. Sin embargo, recientemente se ha visto que no todos los pacientes LTNP presentan una

evolución inmunológica similar a lo largo del tiempo. Por ello, los pacientes LTNP han sido subdivididos en 2 grupos: los no progresores (NP), que mantienen las cifras de CD4+ estables, y los progresores lentos (SP), que presentan una caída progresiva de la cantidad de células CD4+ en el tiempo (Rodes et al., 2004).

Las variables que podrían influir en la no progresión de la enfermedad son: características del propio virus (virulencia de la cepa, vía de contagio, cantidad de inóculo) o distintas características del huésped. Entre estas últimas estarían el repertorio HLA (Westby et al., 1996), perfil de citoquinas y sus receptores (Samson et al., 1996), nivel de anticuerpos neutralizantes (Pilgrim et al., 1997) y una respuesta inmune celular CD8+ potente (Blackbourn et al., 1996). Sin embargo, aún sigue sin esclarecerse la causa de la no progresión. Se han relacionado con la no progresión defectos genéticos en múltiples genes tanto reguladores (*vif*, *vpr*, *vpu*, *rev*, *nef*) como estructurales (*env*) de los virus que infectan dichos pacientes LTNPs, pudiendo ser los causantes de la no progresión en algunos casos (Deacon et al., 1995; Michael et al., 1995; Iversen et al., 1995; Lum et al., 2003). Además, estudios de la región LTR en pacientes LTNP han demostrado que cambios genéticos en dicha región promotora, producen alteraciones de la actividad transcripcional del virus. Así, cambios genéticos y deleciones del sitio Sp1 y zonas adyacentes en pacientes LTNP producen una disminución de la actividad del LTR (Fang et al., 2001; Kondo et al., 2005). También se demostró en un paciente LTNP que múltiples cámbios del nucleótido Guanina (G) a Adenina (A) en los sitios Sp1, NF- κ B y TAR del LTR pueden producir una disminución en los niveles de transcripción viral (Zhang et al., 1997a). Sin embargo, otros trabajos no han encontrado asociación entre alteraciones genéticas encontradas en la región del LTR y el grado de progresión de la enfermedad (Quinones-Mateu et al., 1998; Visco-Comandini et al., 1999).

3. Objetivos

1. Caracterizar genéticamente la región LTR viral a partir de muestras clínicas de pacientes infectados por virus con subtipos no-B del VIH-1 previamente definidas en el gen de la proteasa viral.
2. Analizar los cambios genéticos en la region LTR en diferentes variantes no-B del VIH-1 con respecto a la secuencia de referencia del aislado HXB2 del subtipo B.
3. Comparar el grado de variabilidad genética en las regiones del LTR de interacción con diferentes factores celulares y virales que regulan la transcripción viral. Para ello, se examinarán los diferentes subtipos no-B del VIH-1 con respecto a la secuencia consenso de cada subtipo.
4. Analizar el grado de variabilidad genética en las regiones del LTR de interacción con diferentes factores celulares y virales que regulan la transcripción viral en pacientes con progresión lenta de la enfermedad. Se compararán con respecto a la secuencia de referencia del aislado HXB2 del subtipo B del VIH-1.
5. Estudiar la actividad transcripcional de los promotores LTR en los distintos subtipos del VIH-1 en presencia y ausencia del estímulo celular PMA y de la proteína viral transactivadora Tat.

4. Pacientes, materiales y métodos

4.1. Pacientes

Se seleccionaron 48 pacientes infectados por subtipos no-B del VIH-1 caracterizados filogenéticamente en el gen de la *proteasa* viral, y con seguimiento clínico en el Hospital Carlos III. Las principales características epidemiológicas, inmunológicas y virológicas se exponen en la Tabla 4.1.

Para la caracterización del promotor LTR en pacientes con progresión lenta de la enfermedad, se seleccionaron 17 individuos: 11 progresores lentos (SP) y 6 no-progresores (NP) de la cohorte de pacientes no progresores (LTNP, long term non progressor) del Hospital Carlos III, definidos como en el apartado 2.9 de Introducción. Las principales características inmunológicas y virológicas de los distintos sujetos LTNP durante el tiempo de seguimiento se exponen en la Tabla 4.2. Además, como controles se utilizaron las secuencias LTR de una cohorte de 15 pacientes progresores típicos (TP) naive para tratamiento antirretroviral (Visco-Comandini et al., 1999).

Tabla 4.1. Principales características epidemiológicas, inmunológicas y virológicas de los sujetos estudiados.

Nº	Nº muestra	Origen	CD4+ (cél/s/ul)	Carga viral (copias/ml)	Sexo/edad/GR	Subtipo PR	ART
1	02SP68963	Marruecos	104	434017	M/43/3	D	SI
2	03SP126672	Guinea Ecuatorial	504	4642	M/34/3	U	NO
3	02SP68932	España	378	2236	M/55/3	C	SI
4	03SP131432	Mozambique	132	50	M/38/3	A	SI
5	02SP73172	Guinea Ecuatorial	440	41896	M/45/3	A	NO
6	01SP27595	Guinea Ecuatorial	192	50	F/52/3	G	SI
7	03SP103959	Guinea Ecuatorial	777	354	F/nd/3	A	NO
8	03SP100655	Mozambique	348	52	F/32/3	A	NO
9	99SP11158	Zaire	nd	50	M/44/5	H	SI
10	03SP118828	Guinea Ecuatorial	380	50	M/52/3	A	SI
11	03SP97646	Bélgica	684	50	M/56/2	C	SI
12	03SP131016	Panamá	1040	362	M/32/2	A	SI
13	03SP123900	Francia	528	689	M/40/1	G	SI
14	99SP13569	Etiopia	120	50	F/nd/3	A	SI
15	03SP90779	Guinea Ecuatorial	700	50	M/52/3	C	SI
16	00SP19082	Guinea Ecuatorial	468	4848	F/46/3	C	NO
17	03SP135142	Guinea Ecuatorial	110	131248	F/51/3	U	SI
18	02SP78160	Guinea Ecuatorial	265	31	M/27/3	F	NO
19	98SP7673	Guinea Ecuatorial	nd	617940	M/50/1	C	NAIVE
20	03SP108683	Angola	168	50	F/32/3	D	SI
21	03SP93328	Thailandia	nd	26923	M/nd/3	A	NO
22	03SP93329	Thailandia	nd	4238	nd	A	NO
23	99SP13397	Argentina	nd	4657	F/nd/3	F	NAIVE
24	03SP99938	Argentina	560	160	F/nd/3	F	SI
25	03SP109169	Guinea Ecuatorial	620	65	F/nd/3	G	SI
26	03SP106196	Nigeria	320	3550	M/43/3	G	SI
27	03SP99405	Guinea Ecuatorial	567	704	F/11/5	G	SI
28	03SP123730	Ghana	800	14382	M/34/3	G	NO
29	01SP36729	Liberia	693	50	F/ nd /3	G	SI
30	01SP25518	Zaire	440	779	F/nd/3	G	NO
31	03SP111411	Guinea Ecuatorial	378	50	F/nd/3	G	SI
32	03SP131057	Nigeria	126	0	M/30/3	G	SI
33	99SP13276	Guinea Ecuatorial	841	8327	F/32/3	G	SI
34	02SP75811	Guinea Ecuatorial	50	124	M/44/3	G	SI
35	98SP7031	Liberia	1100	21020	M/34/3	G	NAIVE
36	02SP67175	Nigeria	1008	267	F/23/3	G	NO
37	03SP100609	Camerún	544	50	F/34/3	G	SI
38	02SP48401	Guinea Ecuatorial	483	210743	F/49/3	G	NAIVE
39	03SP110939	Portugal	140	20379	M/34/1	G	NO
40	03SP119304	Guinea Ecuatorial	nd	50	F/32/3	G	SI
41	03SP96716	Guinea Ecuatorial	154	84	F/40/3	H	SI
42	02SP79321	Guinea Ecuatorial	640	50	M/57/3	G	SI
43	98SP7030	Camerún	100	90700	F/35/3	J	NAIVE
44	03SP91571	Guinea Ecuatorial	357	50	M/34/3	J	SI
45	03SP105211	Camerún	342	49631	M/40/3	J	NO
46	03SP118327	Camerún	28	62	M/29/3	G	SI
47	02SP68651	España	360	7946	F/nd/3	G	NO
48	03SP00110777	Guinea Ecuatorial	448	4170	M/37/3	D	SI

GR, grupo de riesgo: 1, adicto a drogas por vía parenteral (ADVP); 2, homosexual; 3, heterosexual; 4, transmisión horizontal; 5, transmisión vertical; nd, no determinado.

PR, proteasa; ART, terapia antirretroviral. Naive, paciente que nunca ha estado en tratamiento antirretroviral.

Tabla 4.2. Características virológicas e inmunológicas de los pacientes LTNP con seguimiento clínico en el Hospital Carlos III.

Nº de pacientes (n=17)	Año de Diagnóstico	Tiempo de seguimiento en el HCIII (años)	Media de Carga viral (copias ARN/ml)	Media de CD4+ (cel/µl)
NP1	1989	6	7.728	837
NP2	1987	6	2.159	652
NP3	1986	6	nd	640
NP4	1985	6	nd	903
NP5	1987	6	78	966
NP6	1985	6	92	1.100
NP7	1988	6	116	1.194
NP9	1989	6	nd	918
NP10	1987	6	967	586
NP11	1987	6	159	746
NP12	1989	6	nd	1.395
SP13	1985	6	1.171	740
SP14	1986	5	500	810
SP16	1985	6	325	525
SP18	1989	6	675	798
SP19	1979	6	2.664	689
SP20	1987	6	477	537

nd, carga viral indetectable en todas las determinaciones.
NP, no progresores; SP, progresores lentos.

4.2. Extracción del ADN viral

A partir de muestras de sangre de los pacientes infectados por virus con subtipos no-B y sujetos LTNPs, se aislaron las CMSPs (células mononucleares de sangre periférica) de cada sujeto con un gradiente de ficoll. A continuación, y previo lavado de los CMSPs con buffer salino PBS 1X (Phosphate Buffered Saline), se

extrajo el ADN celular, en el cual estaría integrado el ADN proviral. Para producir la lisis celular y recuperar el ADN, por cada 10^6 células se añadieron 200 μ l de solución A (KCl 0.1M, Tris 10 mM, Cl₂Mg 2.5 mM) y 200 μ l de solución B (Proteinasa K, 20 μ g / μ l, Tris 10mM, Cl₂Mg 2.5 mM, Tween 20 1%, Tergitol 1%), seguido de una incubación a 59°C durante 1 hora. La extracción y amplificación del ADN viral a partir de los CMSPs de los pacientes TP se describe en la referencia de Visco-Comandini et al., 1999.

4.3. Amplificación y secuenciación de la región LTR

Se usaron diferentes combinaciones de cebadores para la amplificación de la región LTR durante la amplificación del ADN proviral de las diferentes variantes del VIH-1.

4.3.1. Pacientes infectados por distintas variantes del VIH-1

La amplificación de la región LTR (630 pares de bases), se llevó a cabo a partir del ADN proviral extraído de los CMSPs de los pacientes infectados por virus con distintos subtipos del VIH-1 mediante una nested-PCR. La 1^o PCR, externa, se realizó con los oligonucleótidos LTR1D (5'TGGAWGGGYTAATTTACTCCARGAAAAG-3', posiciones -454 a -426) y LTR-R (5'-CAAGCCGAGTCCRGCGTCGAGAG-3', posiciones +683 a +706). Para la 2^o PCR interna (nested), se amplificó el producto de la PCR externa con los oligonucleótidos LTR-BD (5'-GACAAGATATCCTTGATCTGTGGRTCTA-3', posiciones -426 a -399) y LTR-2R (5'-CCTGCGTCGAGAGAGCTYCTCTGG-3',

posiciones +673 a +697). Las posiciones de los cebadores se refirieron respecto al aislado de referencia HXB2 (nº de acceso del GenBank: K03455). Las condiciones de la primera reacción fueron: 94°C/3 min, 40 ciclos de 94°C/40 sg, 50°C/40 sg, y 72°C/1 min, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Las condiciones de la PCR interna fueron las mismas, excepto que la temperatura de hibridación fue a 52°C (Ramírez de Arellano et al., 2005)

4.3.2. Progresores lentos infectados por el subtipo B del VIH-1

La amplificación de la región LTR (630 pares de bases), se llevó a cabo a partir del ADN viral extraído de los CMSPs de los pacientes LTNP, mediante una nested-PCR. La 1º PCR, externa, se realizó con los oligonucleótidos LTR-54D (5'-TAC CAC ACA CAA GGC TAC TTC CCT GA-3') y LTR-718R (5'-GTG CGC GCT TCA GCA AGC CGA GTC C-3'). Para la PCR interna se usaron los cebadores LTR-74D (5'-CCC TGA TTG GCA GAA YTA CAC ACC AGG-3') y LTR-708R (5'-CAG CAA GCC GAG TCC TGC GTC GAG AG-3'). Las condiciones de la primera reacción fueron: 94°C/3 min, 35 ciclos de 94°C/40 sg, 55°C/40 sg, y 72°C/1 min, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Las condiciones de la PCR interna fueron las mismas, excepto para la temperatura de hibridación que fue a 50°C (Ramírez de Arellano et al., 2006a).

El producto de la nested-PCR (amplicón) fue secuenciado directamente en ambas direcciones mediante secuenciación automática utilizando el kit comercial dRhodamine Dye Terminador Ciclo Sequencing (Applied Biosystems, Foster City,

CA) en un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem, Foster city, CA). Los cebadores utilizados en la reacción de secuencia fueron los mismos que se utilizaron en la nested-PCR como cebadores internos. Todas las secuencias LTR obtenidas se editaron utilizando el programa Sequence Navigator versión 1.0 (Applied Biosystems).

Las secuencias LTR utilizadas como controles, se obtuvieron de una cohorte de 15 pacientes progresores típicos de procedencia italiana y suiza (Visco-Comandini et al., 1999)

4.4. Determinación del subtipo genético del VIH-1 mediante análisis filogenético

La caracterización del subtipo genético de la región LTR se realizó mediante el análisis filogenético de las secuencias generadas. Para ello, varias secuencias LTR de referencia de distintos subtipos y recombinantes (CRFs) del VIH-1 grupo M procedentes del GenBank fueron usadas para construir los árboles filogenéticos: AF193275, F196741 y AF196743 (subtipo A); AF196712, AF196713, AF196718 y K03455 (subtipo B); AF102202, AF102207 y AF102218 (subtipo C); AF102222-AF102224 (subtipo D); AF196762-AF196764 (subtipo F); AF102204, AF102206 y AF196759 (subtipo G); AF190127, AF1900128 y AF005496 (subtipo H); AF082394 y AF082395 (subtipo J); AF102216, U51189 y AF19674 (CRF01_AE); AF196755, AJ286133 y AF063223 (CRF02_AG); AF049337 y AF119819 (CRF04_cpx);

AJ288981, AJ245481 y AJ288982 (CRF06_cpx); AJ291718, F179368 y AJ291719 (CRF11_cpx).

Los patrones de recombinación genética del genoma completo de las formas recombinantes CRF01_AE, CRF02_AG, CRF04_cpx, CRF06_cpx, CRF11_cpx se muestran en el Anexo 1.

La topología del árbol fue obtenida usando el método de Neighbour-Joining. El alineamiento múltiple de las secuencias LTR se realizó automáticamente utilizando el programa Clustal X (Thompson et al., 1994), eliminando las columnas que contenían desapareamientos y gaps. Una vez alineadas todas las secuencias, la matriz de distancias evolutivas fue estimada usando el parámetro de Kimura localizado dentro del programa ADNDIST (paquete PHYLIP). Para otorgar fiabilidad a la topología del árbol filogenético obtenido, se realizó un bootstrap de 1.000 repeticiones. Las nuevas secuencias LTR subtipadas fueron depositadas en el GenBank usando el programa Sequin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin>).

Además, el subtipo genético de algunas secuencias LTR, se comparó con el obtenido mediante dos métodos distintos de subtipaje rápido usando las siguientes páginas Webs: www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping (NCBI: National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y <http://www.bioafrica.net/subtypetool/html/index.html> (REGA HIV subtyping tool, Leuven University, Leuven, Belgium).

La caracterización del subtipo genético de la región LTR de los virus que infectaron a los pacientes LTNP y TP se determinó previamente mediante el análisis filogenético de secuencias en el gen *nef* (Rodes et al., 2004) y en la región V3 del gen de la envuelta (Visco-Comandini et al., 1999), respectivamente.

4.5. Obtención de las secuencias consenso LTR de los diferentes subtipos del VIH-1

Para la generación de cada una de las secuencias consenso LTR de los diferentes subtipos no-B del VIH-1 (A, C, D, F, G y H) y recombinantes CRF01_AE y CRF11_cpx, se utilizaron todas las secuencias LTR disponibles en el GenBank (www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html). Dichas secuencias se alinearon por subtipos con el programa Clustal X (Thompson et al., 1994). Después, mediante el programa SVARAP, de análisis cuantitativo de la variabilidad de nucleótidos y aminoácidos (Colson et al., 2006), se generaron las secuencias consenso de cada subtipo del VIH-1.

4.6. Cálculo de frecuencia de mutante

Se definió la frecuencia de mutante como el número de mutaciones encontradas en una región del LTR concreta con respecto a una secuencia consenso dividido entre el número total de nucleótidos de dicha región. Este cálculo se realizó en cada una de las regiones del LTR, que se sabe que son importantes para la regulación de la transcripción de los genes del VIH (Figura 2.3). Para

determinar la variabilidad genética intrasubtipo de la región LTR y poder compararla entre las diferentes variantes del VIH-1 grupo M, se calculó la frecuencia de mutante del LTR de cada variante respecto a su secuencia consenso correspondiente.

Para comparar las frecuencias de mutante entre los grupos de pacientes se usaron el test exacto de Fisher o la chi cuadrado, incluidos dentro del programa Epi Info versión 6.02 (CDC, Atlanta, GA). Aquellos valores con $p < 0.05$ se consideraron como significativos.

4.7. Generación de clones moleculares con las secuencias LTR de los distintos subtipos del VIH-1 obtenidas de muestras clínicas

Se llevó a cabo el clonaje en vectores de expresión de los productos amplificados de la región LTR de las secuencias más representativas de los subtipos A, C y G del VIH-1 (cercanas a su consenso). Para el resto de subtipos y formas recombinantes, se clonaron las 2 únicas secuencias LTR disponibles de cada uno de ellos. Para ello, se realizaron los pasos que describimos a continuación.

4.7.1. Obtención del inserto LTR (U3+R)

A partir de la primera PCR generada como se expone en el apartado 4.3.1, se realizó una nested-PCR a partir del producto amplificado en la primera PCR con oligonucleótidos específicos que incluyen en su extremo 5' secuencias diana para

distintas enzimas de restricción. Los cebadores utilizados fueron LTR-Xho I (5'-GGGCCCC/TCGAGCCCTGATTGGCAGAAYTACACACCAGG-3', posiciones -381 a -354 respecto al aislado HXB2) y LTR-Hind III (5'-GGGCCCCA/AGCTTCCTGCGTCGAGAGAGCTYCTCTGG-3', posiciones +673 a +697 respecto al aislado HXB2). El 1º oligonucleótido incluyó el sitio de restricción Xho I (C/TCGAG) en el extremo 5' de la región LTR y el 2º cebador el sitio Hind III (A/AGCTT) en su extremo 3'. Las condiciones de la nested-PCR fueron las mismas que describimos anteriormente en el apartado 4.3. El fragmento clonado fue la región U3+R del LTR (ver Figura 2.3), ya que el inicio de U5 incluye un sitio de restricción para Hind III y fue digerido por dicha enzima.

4.7.2. Obtención del vector plasmídico de expresión (pGL2-Basic)

El vector pGL2-basic (Promega) es el plásmido diana donde se clonaron los fragmentos LTR (Schwartz et al., 1990). Dicho vector contiene 5598 pares de bases (pb). Dispone de una región del polilinker donde se clonaron los fragmentos de interés U3+R, (que incluye los sitios de corte para múltiples enzimas de restricción incluidas Xho I y Hind III), y el gen reporter o marcador de la luciferasa, gracias a cuya expresión podemos medir la actividad del promotor clonado. Asimismo, el vector incluye un gen de resistencia a ampicilina (Amp^r), que nos permitió la selección de los clones recombinantes, así como el sitio Ori, que es el origen de replicación del plásmido (Figura 4.1). Para generar el plásmido a gran escala, se procedió a su transformación en bacterias *E. coli* competentes (Gold supercompetent, Stratagene) para su posterior purificación con un Kit comercial (Kit Hispeed midi prep, Qiagen)

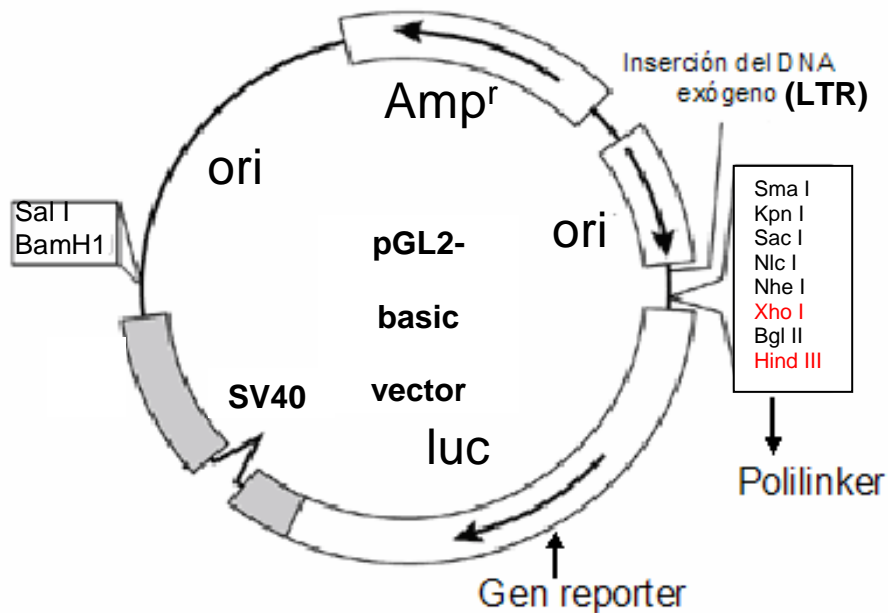


Figura 4.1. Esquema del vector de expresión pGL2 basic utilizado para clonar los distintos promotores LTR de los diferentes subtipos del VIH-1 en la región del polilinker. En rojo se muestran los enzimas de restricción utilizados para la digestión del vector.

4.7.3. Digestión

Como paso previo a la generación del clon molecular recombinante, se digirió tanto el vector pGL2 como el producto amplificado del LTR a ensayar con los mismos enzimas de restricción: Xho I y Hind III. Para ello, se incubó 1 µgr de cada fragmento LTR amplificado por PCR con 1 µl de los enzimas Xho I (10 unidades/µl) y Hind III (15 unidades/µl) (Takara) a 37°C con agitación toda la noche. Después se inactivaron los enzimas incubando durante 5 minutos a 65°C. La digestión por ambos

enzimas generó extremos cohesivos tanto en el producto amplificado como en el vector pGL2 basic (Figura 4.2).

4.7.4. Ligación

Una vez generados los mismos extremos cohesivos en el inserto y el vector, se procedió a su ligación para la obtención de los plásmidos recombinantes. Para ello, se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche 100, 250 o 450 ngr del fragmento LTR (U3+R) digerido junto con 10 ngr del vector pGL2 linearizado (relación molar 1:1, 1:2,5 y 1:5, respectivamente). La ligación se realizó utilizando 0,5 µl del enzima T4 ADN ligasa (Promega) y 2 µl del buffer T10X (Promega), complementando con H₂O destilada estéril hasta completar un volumen final de 20 µl (Figura 4.2).

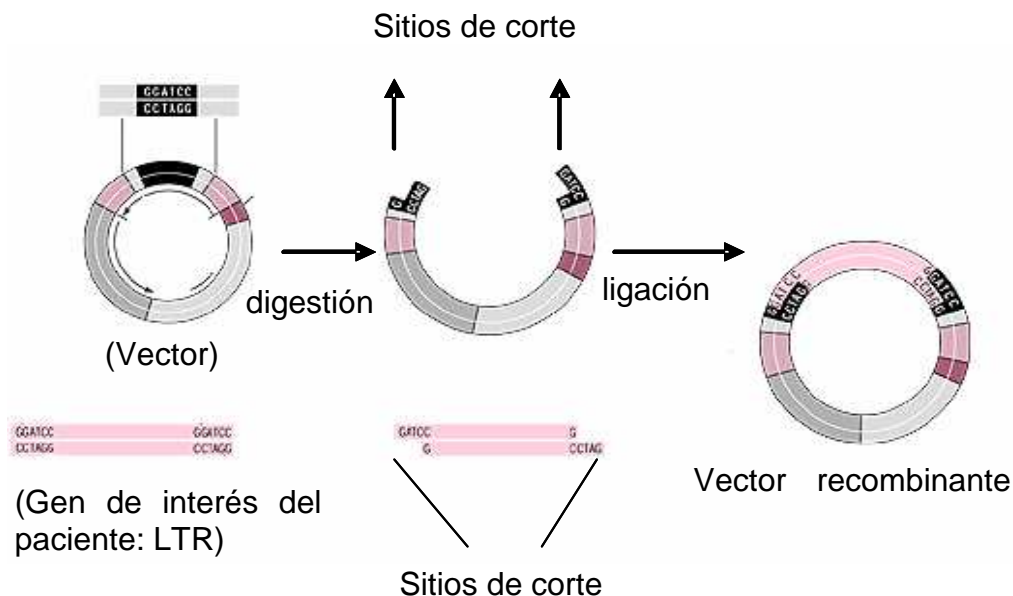


Figura 4.2. Esquema de la digestión y ligación molecular entre un vector y un gen o región de interés.

4.7.5. Transformación de los plásmidos recombinantes

Para obtener los plásmidos recombinantes, se transformaron en cepas de bacterias hospedadoras altamente competentes *E. coli* DH5 α (Inoue et al., 1990) o *E. coli* Gold supercompetent (Stratagene). Para ello, se añadió de 0,01 a 50 ngr de ADN a transformar (plásmido recombinante con la región LTR de interés) por cada alícuota de 50 μ l de células competentes y se incubó en hielo durante 30 minutos en un ambiente estéril. La transformación del plásmido recombinante en la bacteria hospedadora, se realizó mediante choque térmico a 42°C ó a 54°C durante 1 minuto, según fueran las células a transformar *E. coli* DH5 α o Gold supercompetentes, respectivamente. Después se incubó a 37°C una hora con agitación en 250 μ l-500 μ l de medio LB líquido (10 gr/l de bactotripton, 5 gr/l de extracto de levadura y 5 gr/l de NaCl, Pronadisa) estéril previamente atemperado, y se plaqueron 200 μ l en placas preparadas previamente con medio LB-agar (15 gr de agar por litro de LB líquido) sólido estéril al que se había añadido ampicilina a una concentración final de 50 μ gr/ml.

Para comprobar la eficacia de la transformación, se utilizó el vector sin digerir como control positivo, y un vector digerido sin inserto como control negativo. La existencia de crecimiento bacteriano en los controles bacterianos refleja una digestión poco eficiente o por religaciones del propio vector.

4.7.6. Selección de los plásmidos recombinantes

Identificamos las bacterias transformadas con nuestro plásmido recombinante, gracias a la presencia del gen de resistencia a ampicilina en nuestro plásmido (Figura 4.1). De esta forma, al añadir dicho antibiótico al medio de cultivo (LB-agar) crecieron sólo aquellas bacterias que habían sido transformadas, es decir, las que han incorporado el plásmido. Dicho plásmido podría llevar incorporado nuestro fragmento LTR (plásmido recombinante) o no, en cuyo caso la digestión o la ligación no habría sido eficiente. Al cabo de 24h, tras la inoculación de las placas, se picó un número representativo de colonias bacterianas crecidas en el medio LB-agar más ampicilina. Después se inocularon en tubos de minicultivo con medio LB líquido y ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. La lisis bacteriana para extraer y purificar los plásmidos se realizó con el Kit Qiaprep spin Miniprep (Qiagen). Para la selección de los plásmidos recombinantes portadores de nuestro fragmento de interés, se realizó la digestión de todos los plásmidos purificados obtenidos con los enzimas de restricción Xho I y Hind III, en las mismas condiciones de la digestión descritas anteriormente en el apartado 4.7.3. Mediante electroforesis en gel de agarosa se determinó la presencia del inserto en el plásmido transformado en la bacteria competente.

Para confirmar la secuencia LTR insertada en los plásmidos recombinantes seleccionados, se realizó la secuenciación automática de dicha región utilizando el kit comercial dRhodamine Dye Terminador Ciclo Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem, Foster city, CA). Los cebadores utilizados en la reacción de secuencia fueron los

mismos que se utilizaron en las nested-PCR internas de amplificación del LTR, descritos anteriormente en el apartado 4.3.1. Para la conservación del stock de plásmidos recombinantes generados, se procedió a su congelación a -80°C en glicerol estéril al 87%.

Aquellos plásmidos recombinantes que presentaron la misma secuencia LTR que su PCR de amplificación inicial fueron seleccionados para los ensayos funcionales, excepto la muestra nº 20 (subtipo D). En ésta, los clones moleculares fueron obtenidos de la PCR de amplificación inicial de otras muestras del mismo paciente como se expondrá mas adelante en los resultados (Figura 5.3 de Resultados).

4.7.7. Amplificación y purificación de los plásmidos recombinantes seleccionados

Para la amplificación de los plásmidos que llevaban el inserto LTR de interés, que serían utilizados posteriormente en los ensayos funcionales, se inoculó su colonia fresca o 100 µl del glicerolado correspondiente, en 3 ml de medio LB y ampicilina (100 ngr/ml) durante 6h a 37°C con agitación. Después, se realizó una dilución 1:500 en medio fresco con antibiótico y se dejó crecer a 37°C durante 12-16 h. La purificación de dichos plásmidos se realizó con el Kit Hispeed Maxi prep (Qiagen). Una vez purificados, se procedió a su cuantificación en un biofotómetro (Eppendorf).

4.8. Ensayos de transfección

A partir del stock de plásmidos recombinantes generado, se transfectó la línea celular diana (Jurkat) en la cual realizamos los ensayos funcionales del LTR en presencia y ausencia de la proteína viral Tat.

Los ensayos de transfección se realizaron en placas de 12 pocillos (M12), utilizando 4 pocillos por cada plásmido recombinante a ensayar. En dos se medía la actividad del LTR basal en presencia y ausencia de PMA y en otros dos pocillos se medía la actividad inducida por Tat en presencia y ausencia de PMA (Figura 4.3). Dichos ensayos, se repitieron por cuadruplicado para cada uno de los plásmidos recombinantes analizados. A continuación, explicaremos las etapas de transfección y condiciones ensayadas con más detalle.

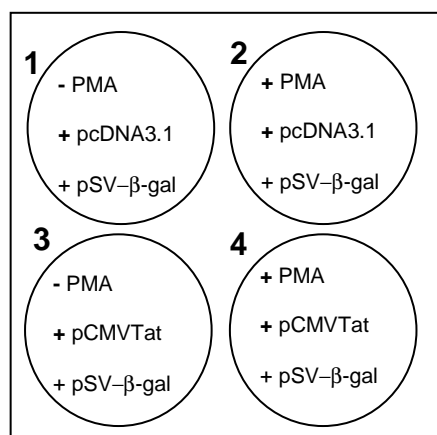


Figura 4.3. Esquema de los 4 pocillos utilizados por cada plásmido recombinante a ensayar donde se midió la actividad del LTR basal (+pcDNA3.1) o inducida por Tat (+pCMVTat), en presencia (+PMA) y ausencia (-PMA) del estímulo celular PMA.

4.8.1. Línea celular

Para los ensayos de transfección se emplearon células Jurkat, que es una línea tumoral de linfocitos T con fenotipo CD3+, CD4+, DR-. Para el mantenimiento de dicha línea celular, se utilizó el medio de cultivo RPMI (Biowhittaker) suplementado con 10 µl de glutamina (a una concentración inicial de 200 nM), 5 µl de antibiótico (penicilina/estreptomicina a una concentración inicial de 5.000 U/ml) y 10% de Suero de Ternera Fetal (SBF). El conteo de las células se realizó en PBS 1x en cámara de Neubauer.

Se utilizaron 9×10^6 células por cada transfección tanto en ausencia (actividad basal) como en presencia de Tat. Además, para poder analizar dicha actividad basal e inducida por Tat en ausencia o presencia de un estímulo celular (PMA), repartimos el número de células iniciales, creciendo en cada pocillo un total de $4,5 \times 10^6$ células para cada condición. Cada condición diferente de cada muestra analizada fue repetida por cuadruplicado.

4.8.2. Vectores plasmídicos cotransfectados

La cantidad de ADN a electroporar fue de 1 µgr por cada 10^6 células, electroporando un total de 9 µgr por cada ADN plasmídico recombinante. Los plásmidos que se cotranfectaron junto con cada uno de los plásmidos recombinantes que llevan nuestro inserto LTR de interés fueron:

- a) El plásmido pcDNA3.1 (+/-) (Figura 4.4) (Invitrogen), utilizado para ajustar el volumen de la reacción para las transfecciones sin Tat (pocillos 1 y 2, Figura 4.3.).

- b) El plásmido pCMVTat (Schwartz et al., 1990; Hazan et al., 1990), que contiene los dos exones de Tat (101 aminoácidos) del subtipo B del VIH-1 y está clonado bajo el promotor del Citomegalovirus (CMV) en un vector pcDNA3.1 (Figura 4.4). Se empleó para medir el nivel de transactivación de cada promotor LTR en presencia de Tat (pocillos 3 y 4, Figura 4.3)

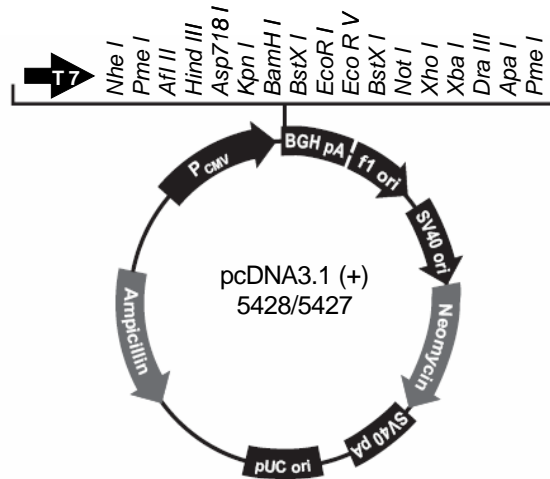
- c) El plásmido pSV- β -galactosidasa (Promega), empleado para normalizar el número de células de cada transfección. Por tanto se incorporó en todas las transfecciones (Figura 4.3) junto con el resto de vectores plasmídicos. Así fue posible cuantificar la expresión de la proteína β -galactosidasa, generada a partir del gen *Lac Z* presente en dicho vector (Figura 4.4) y se pudo normalizar la eficiencia de transfección en cada ensayo y condición.

En resumen, cada uno de los plásmidos pGl2-basic recombinantes generados fueron cotransfectados junto con el vector pCMVTat (para medir la actividad del LTR inducida por Tat) o con el vector control pcDNA 3.1 (para medir la actividad del LTR basal), en presencia o ausencia de estímulo (PMA), y con el vector pSV- β -galactosidasa (para normalizar el número de células en todas las transfecciones) (Figura 4.3).

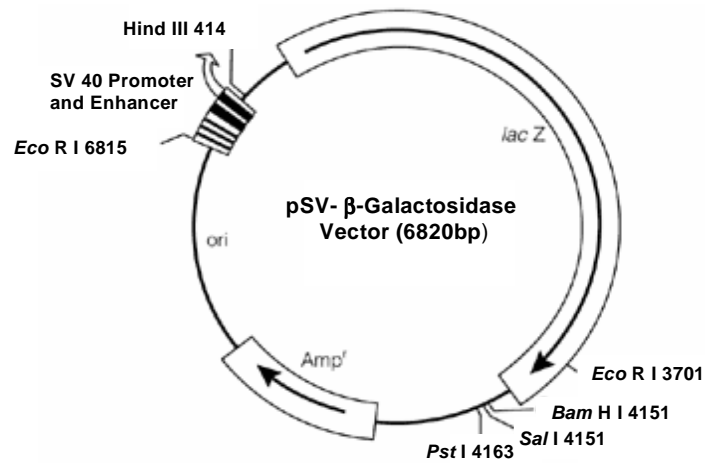
4.8.3. Activador utilizado

Para la estimulación celular de todas las transfecciones realizadas en la línea celular Jurkat se utilizó el forbol miristato acetato (PMA, Sigma) a una dilución final de 1:10.000 de un stock de 20 ngr/ml.

A)



B)



C)

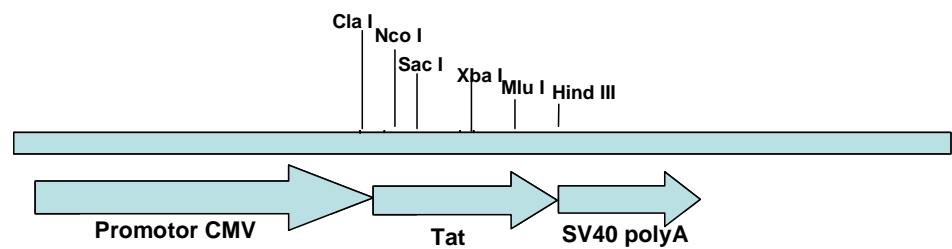


Figura 4.4. Plásmidos utilizados en las transfecciones. A) pcDNA3.1; B) pSV- β -Galactosidase vector; C) pCMVTat.

4.8.4. Electroporación

La electroporación de todos los vectores plasmídicos de expresión se llevó a cabo en cubetas de 4mm (casa comercial BTX). Las células Jurkat fueron resuspendidas en medido RPMI sin enriquecer con SBF y transfectadas mediante pulsos eléctricos utilizando un electroporador (modelo EasyJet, casa comercial Equibio). Las condiciones de electroporación para las células Jurkat fueron: 280 V, 1500 μ F y resistencia máxima. Las células fueron incubadas a 37°C y recuperadas 24 horas después de la transfección.

4.8.5. Ensayos de actividad luciferasa

Las células Jurkat transfectadas en las distintas condiciones previamente descritas, fueron lavadas con PBS 1x y resuspendidas en 300 μ l de tampón de lisis 1X (Luciferase Cell Culture Lysis 5X Reagent, Promega). La actividad luciferasa se midió cuantificando la emisión lumínica en un luminómetro (modelo Sirius, casa comercial Bherthod). Para ello, recogimos el extracto proteico del lisado celular y añadimos el sustrato luciferina (Luciferase Assay System, Promega). Por cada 50 μ l de extracto proteico añadimos 50 μ l del sustrato. La emisión lumínica se cuantificó al comienzo de la reacción enzimática y fue proporcional a la cantidad de luciferasa expresada a partir del promotor LTR presente en el extracto proteico. Los datos obtenidos se expresaron en Unidades Relativas de Luciferasa (URLs).

4.8.6. Ensayos con β -galactosidasa

La cuantificación de β -galactosidasa de todas las transfecciones, expresada a partir del gen Lac Z, se midió por reacción colorimétrica en un espectrofotómetro, donde se determinaron las absorbancias a una longitud de onda de 450 nm. Para ello, añadimos 150 μ l del buffer Assay 2X (kit β -galactosidase Enzyme Assay System, Promega) a 150 μ l del extracto proteico del apartado anterior 4.8.5. La reacción colorimétrica se paró con 500 μ l de TRIS 1M.

4.8.7. Normalización de los datos

El factor de corrección (para normalizar el número de células utilizadas en cada uno de los experimentos) aplicado a cada valor de URL inicial, obtenido para cada una de las diferentes condiciones de cada transfección (valor de actividad basal o inducida con Tat, en presencia o ausencia de PMA), se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de corrección} = \frac{\text{valor más bajo de } \beta\text{-galactosidasa}}{\text{valor } \beta\text{-galactosidasa de cada muestra}}$$

Por tanto, el valor URL final asignado a cada una de las diferentes condiciones de cada muestra fue el siguiente:

Valor URL final: Factor de corrección x valor URL inicial

El valor final de URL asignado a cada plásmido recombinante analizado, se halló de la media entre los valores obtenidos en los experimentos realizados por cuaduplicado. Además, se asignó un único valor URL por subtipo del VIH-1 hallando la media entre los valores de URLs correspondientes a los plásmidos recombinantes transfectados con igual subtipo genético. El valor URL final asignado a cada uno de los promotores LTR de los diferentes subtipos analizados reflejaría el grado de actividad transcripcional de cada uno de ellos.

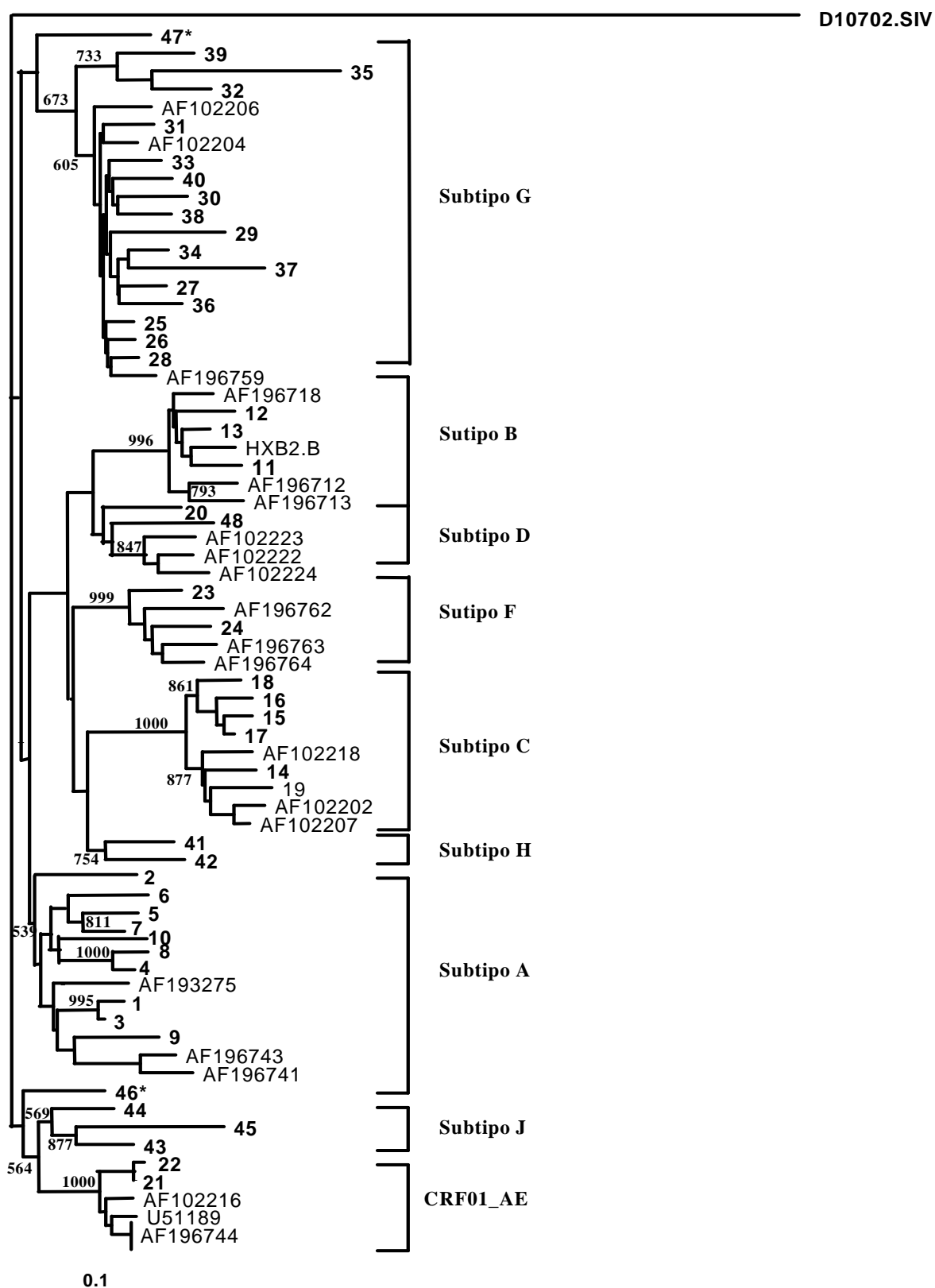
5. Resultados

5.1. Caracterización genética de la región LTR

La determinación del subtipo genético mediante análisis filogenético de la región LTR de las 48 muestras previamente subtipadas en el gen PR dio como resultado los siguientes subtipos: 10A, 3B, 6C, 2D, 2E, 2F, 16G, 3J, 2H y 2U (subtipo indeterminado) (Ramírez de Arellano et al., 2005)(Figura 5.1). El subtipo de cada muestra fue confirmado con varios árboles filogenéticos independientes dando altos valores de bootstrap, tanto manteniendo como eliminando los nucleótidos de la región polimórfica MFLNP del LTR, y tomando como raíz la secuencia LTR del virus VIS (nº de acceso D10702). Los números de acceso del GenBank y el subtipo asignado a las secuencias LTR se muestran en la Tabla 5.1.

Posteriormente, se realizó un nuevo análisis filogenético con las muestras con subtipo J, H y U (nº del 41-47, Tabla 5.1) tomando como raíz la secuencia LTR del aislado de referencia HXB2 del subtipo B del VIH-1 (Figura 5.2). Para ello, se alinearon con nuevas secuencias de subtipos J, H y recombinantes (CRF02_AG, CRF04_cpx, CRF06_cpx y CRF11_cpx) depositadas en el GenBank durante el transcurso del estudio por otros grupos (Figura 5.2). Así, los subtipos que inicialmente se definieron como J en la región LTR (nº 43, 44 y 45, Tabla 5.1), se caracterizaron como posibles recombinantes CFR11_cpx en el nuevo árbol filogenético (Figura 5.2). Este resultado se confirmó introduciendo la secuencia LTR en una página Web de subtipaje rápido (NCBI) que define automáticamente el subtipo en diferentes regiones del genoma (ver apartado 4.4) (Tabla 5.2). Además, el subtipo genético en otras regiones secuenciadas del genoma viral de dichas muestras fue similar al patrón de recombinación de los CRF11_cpx previamente definido (<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/CRFs/CRFs.html>).

Figura 5.1. Árbol filogenético de las secuencias LTR. En negrilla están representadas las 48 muestras utilizadas en el estudio.



*Con asterisco, muestras con subtipo indeterminado (U) en el LTR.

Tabla 5. 1. Números de acceso y subtipo genético de la región LTR y del gen de la *proteasa* en las muestras analizadas.

Nº	Nº muestra	Subtipos en LTR	Nº acceso LTR	Subtipos en PR	Nº acceso PR
1	02SP68963	A	AY611005	D	AF354018
2*	03SP126672	A	AY610996	U	AY642106
3	02SP68932	A	AY610975	C	AF125282
4	03SP131432	A	AY610988	A	AY642109
5	02SP73172	A	AY610966	A	AY248329
6	01SP27595	A	AY610976	A	AY248325
7*	03SP103959	A	AY610964	A	AY642099
8	03SP100655	A	AY610967	A	AY642098
9	99SP11158	A	AY610995	H	AF125286
10	03SP132038	A	AY610997	A	AF188349
11	03SP97646	B	AY610971	C	AY248333
12*	03SP131016	B	AY610959	A	AY642108
13	03SP123900	B	AY610991	G	AF354036
14	99SP13569	C	AY610998	A	AF188350
15	03SP90779	C	AY610970	C	AF354014
16	00SP19082	C	AY610972	C	AF354013
17*	03SP135142	C	AY610960	U	AY642103
18*	02SP78160	C	AY610985	F	AY642112
19*	98SP7673	C	AY610986	C	AF125283
20	03SP108683	D	AY611003	D	AY642105
21*	03SP93328	CRF01_AE	AY610969	A	AY642111
22*	03SP93329	CRF01_AE	AY610968	A	AY642107
23*	99SP13397	F	AY610963	F	AF354015
24	03SP99938	F	AY610962	F	AF125284
25	03SP109169	G	AY610994	G	AF125293
26	03SP106196	G	AY610983	G	AF354424
27	03SP99405	G	AY610980	G	AF354025
28	03SP123730	G	AY611000	G	AF125291
29	01SP36729	G	AY610999	G	AF354030
30	01SP25518	G	AY610993	G	AF354021
31	03SP111411	G	AY611002	G	AF354003
32*	03SP131057	G	AY610961	G	AY642102
33	99SP13276	G	AY610992	G	AF125292
34	02SP75811	G	AY611001	G	AF455665
35*	98SP7031	G	AY610973	G	AF125289
36	02SP67175	G	AY610974	G	AY248356
37	03SP100609	G	AY610981	G	AY248358
38*	02SP48401	G	AY610984	G	AY248299
39*	03SP110939	G	AY610990	G	AY642100
40	03SP119304	G	AY611004	G	AY642101
41	03SP96716	H	AY610979	H	AY248396
42	02SP79321	H	AY610988	G	AY248371
43*	98SP7030	J	AY610965	J	AF188348
44	03SP91571	J	AY610978	J	AY248331
45	03SP105211	J	AY610982	J	AY642104
46	03SP118327	U	AY610987	G	AF455667
47	02SP68651	U	AY610977	G	AY642110
48	03SP00110777	D	EF380393	D	EF380384

*Los asteriscos hacen referencia a los sujetos donde la misma muestra fue secuenciada en ambas regiones (LTR/PR).

Los subtipos definidos previamente como H (nº 41 y 42) en LTR, se agruparon en el nuevo árbol filogenético junto con las secuencias H de referencia disponibles en el GenBank (Figura 5.2) y también fueron confirmadas por el método de subtipaje rápido NCBI (Tabla 5.2).

Las 2 muestras con subtipo indeterminado (U) en LTR (nº 46 y 47), se redefinieron como posibles recombinantes entre CRFs (Figura 5.2). Así, la muestra nº 46 se caracterizó como posible recombinante entre secuencias CRF11_cpx y CRF06_cpx y la muestra nº 47 como posible recombinante entre secuencias CRF06_cpx y CRF02_AG, tras el segundo análisis filogenético y subtipaje rápido NCBI (Figura 5.2; Tabla 5.2). El método de subtipaje rápido REGA no determinó el tipo de variante en ninguna de las muestras. Los patrones de recombinación genética en el genoma completo de las formas recombinantes CRF02_AG, CRF06_cpx y CRF11_cpx, se muestran en el Anexo 1.

Un hecho a destacar es que un 37% de las muestras analizadas resultaron ser virus recombinantes, observándose distintos subtipos cuando se analizaban las regiones codificantes del LTR y de la PR viral. Así encontramos los siguientes recombinantes LTR/PR: 1A/D, 1A/U, 1A/C, 1A/H, 1B/C, 1B/A, 1B/G, 1C/A, 1C/U, 1C/F, 1H/G, 2E/A (CRF01_AE) y 2U/G (Tabla 5.1). Además, se incluyeron como recombinantes 3 muestras caracterizadas como posibles CRF11_cpx en la región del LTR, con subtipo J en el gen de la PR (Tabla 5.2).

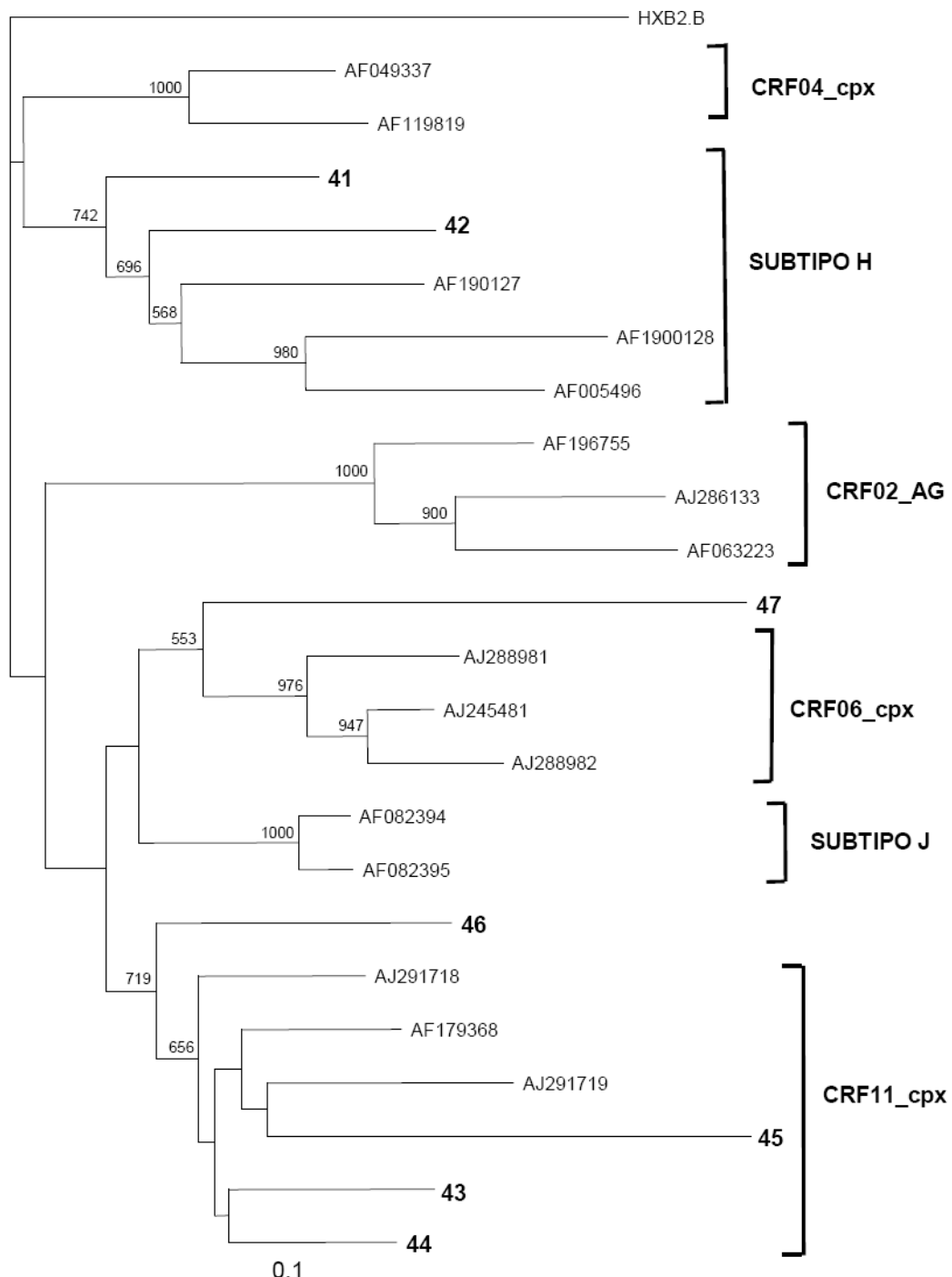
Tabla 5.2. Subtipo genético en diferentes genes del VIH-1 en las muestras con subtipo J, H y U (indeterminado)

Muestra	1º análisis filogenético	2º análisis filogenético	Análisis filogenético de otros genes					Subtipaje rápido (NCBI)*
	Región LTR	Región LTR	gag	PR	RT	gp120	gp41	Región LTR
41	H	H	H	H	nd	nd	nd	H
42	H	H	nd	G	G	nd	nd	H
43	J	Posible CRF11_cpx	nd	J	J	A	nd	CRF11_cpx
44	J	Posible CRF11_cpx	nd	J	J	nd	U	CRF11_cpx
45	J	Posible CRF11_cpx	U	J	J	nd	J	CRF11_cpx
46	U	U, posible CRF11_cpx recombinante con otras variantes	A	G	K	A	nd	CRF11_cpx/CRF06_cpx
47	U	U, posible CRF06_cpx recombinante con otras variantes	nd	G	G	nd	nd	CRF06_cpx/CRF02_AG

nd; no determinado

* Único método de subtipaje rápido que nos caracterizó la región LTR.

Figura 5.2. Árbol filogenético con nuevas secuencias de referencia de subtipo J, H, y varios recombinantes. En negrilla están representadas las muestras del estudio subtipadas. El resto son secuencias de referencia obtenidas del GenBank.



5.2 Cambios genéticos de la región LTR en distintas variantes del VIH-1

Todas las secuencias LTR obtenidas de las 48 muestras infectadas por las distintas variantes del VIH-1 se muestran en la Figura 5.3, en la cual se señalan los sitios importantes para la regulación transcripcional del VIH-1.

A pesar de que la región U3 del LTR presenta la mayoría de los sitios de unión de factores celulares reguladores de la transcripción, se observaron cambios genéticos en las distintas variantes no-B del VIH-1 con respecto a la secuencia del aislado HXB2 de subtipo B (Figura 5.3). Así, los sitios RBF-1, RBF-2, NF- κ B (I, II) y Sp1 (I) fueron los más conservados en la mayoría de los subtipos no-B del VIH-1. Por el contrario, las secuencias de unión a NF-AT1, Core-NRE, LEF-1, Sp1 (II, III) y TAR fueron las que presentaron mayores cambios genéticos (Figura 5.3).

Figura 5.3. Secuencias LTR de las 48 muestras infectadas por los distintos subtipos del VIH-1. En azul están representadas las secuencias LTR que fueron clonadas y analizadas funcionalmente. En rojo se muestran las secuencias LTR que estaban hipermutadas. Las secuencias LTR de los clones moleculares seleccionados fueron las mismas que la de su PCR de amplificación inicial, representada en azul, excepto para la muestra nº 20 (subtipo D) cuyos clones moleculares fueron obtenidos de otras muestras secuenciales del mismo paciente.

-137

[illegible]

Figura 5.3. (continuación).

		TAR			
		Base	Bucle	Loop	Base
HXB2	-16	+1			
		GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGG--CTAACTAGGGAAACC			
1A	C..T.....	A..G..G.....	T.....	T.....
2A	C..C.....	T.....C--	G..A.....
3A	C..C..T.....	A..G.....T..	G.....
4A	C.....	T..G.....	A-.....	G..AG.....
5A	C.....	T.....AA..	G..-.....
6A	C.....	T.....T.....	G..AG.....
7A	C..T.....	T.....AA..	G..G.....
8A	C.....	T..G.....	A-.....	G..A.....
9A	C..T.....	A..G.....	G.....
10A	C..C.....	T..G.....	T-.....	T..GG.....
11B		A..C..G.....	GG.....
12B		G.....
13B	G.....	G.....
14C	C.....	A..G.....	TT.....
15C	C.....	G.....	T.....
16C	C.....	G.....	G.....
17C	C.....	G.....	T.....
18C	C.....	G.....	T.....
19C	C.....	A..G.....	T.....	CT..G.....
20D	C.....	A.....	T.....A.....	G.....
48D	C.....	T.....A.....	G.....
21.CRF1	C..T.....	T.....C.....	A--..G..A.....
22.CRF1	C..T.....	T.....C.....	A--..G..A.....
23F		A.....	G.....
24F	C.....	A.....	T.....	G.....
25G	C..C.....	C.....T..C.....	T.....	A--..G..AG.....
26G	C..C.....	T..C.....	T.....	A--..G..AG.....
27G	C..C..T.....	T..C..G.....	T.....	G--..A.....
28G	C..C.....	T..C.....	T.....	A--..G..AGA.....
29G	C..C.....	T..T..C..A.....	T..A.....	AA--..G..AGA..A.....
30G	C.....	T..C.....	C.....	G..-G.....
31G	CAC.....	T.....	T.....	G..AGA.....
32G	C..C.....	T.....	C..TC.....	G..AC.....
33G	C..C.....	T..T..C.....	T.....	A--..G..AGAA.....
34G	C..C.....	T..C.....	T.....	--T..G..-G..A.....
35G	C..C.....	TA.....
36G	C..C..T.....	T..C.....	T.....	A--..GTA.....
37G	C.....	AA.....T..C.....	T..A.....AA.....	A--..GTA..AA.....
38G	C..C.....	T..G.....	T.....	--..A.....
39G	C..C.....	T..C.....	T.....	GTAG.....
40G	C..C.....	T..C.....	T.....	A--..G..AG.....
41H	C.....	G.....A.....
42H	CC.....G.....	N.....	G.....
43.CRF1	C.....	A.....	C.....	G.....
44.CRF1	C.....	A..G.....	C.....	G.....
45.CRF1	C.....T.....	A.....A.....	AA.....	G.....A.....
46	C..T.....	T..T..C.....	GTAGA.....
47	C..C.....	T.....	T.....	G..AG.....

Figura 5.3. (continuación).

Con relación al número de sitios Sp1 localizados en el promotor de U3 (posición -46 a -81 del aislado HXB2), se observó que todos los subtipos del VIH-1 presentaban tres sitios (Figura 5.3). Estudios *in vitro* previos ya demostraron que los sitios Sp1 (I) y (II) (position -46 a -69) eran los responsables de la actividad promotora del LTR, mientras que el sitio Sp1 (III) (posición -70 a -81) tenía un mínimo efecto en la transcripción viral (Jones et al., 1986). Es interesante destacar que encontramos diferencias genéticas en los tres sitios Sp1 (I, II, III) de las distintas variantes no-B del VIH-1 analizadas respecto al aislado de referencia HXB2 de subtipo B (Figura 5.3). Todos los subtipos presentaron más cambios genéticos en el sitio Sp1 (III), excepto las LTRs de las variantes A, G y CRF01_AE, que presentaron mayor variabilidad en el sitio Sp1 (II) (Figura 5.3). Este resultado sugiere que el sitio Sp1 (I) sería el sitio más importante en la regulación de la transcripción por estas proteínas.

Las regiones de unión del factor RBF-1 y RBF-2 (posición -145 a -148 y -122 a -130, respectivamente), estaban muy conservadas en todos los subtipos (Figura 5.3), al igual que ya se observó en estudios anteriores (Jeeninga et al., 2000).

5.2.1. Patrones de secuencia específicos de subtipo

En el presente estudio se analizó la presencia de patrones de secuencia específicos en determinadas regiones del LTR de diferentes subtipos del VIH-1 con respecto a la secuencia del aislado HXB2. Así, en la región de unión del factor NF- κ B (posición -84 a -109 del aislado HXB2), observamos tres sitios NF- κ B en todos

los subtipos C analizados, 1 sitio en los virus caracterizados como recombinante CRF01_AE y 2 sitios en el resto de variantes analizadas (A, B, D, F, G, H y CRF11_cpx), como previamente se había publicado por varios autores en la mayoría de esas variantes (Montano et al., 1997; Naghavi et al., 1999; Jeeninga et al., 2000; Roof et al., 2002). Conviene resaltar que en todos los subtipos C analizados encontramos mutaciones en el primero de los tres sitios NF- κ B (I) (Figura 5.3), al igual que también publicaron trabajos previos (Jeeninga et al., 2000).

Otro patrón de secuencia específico de subtipo previamente descrito es el cambio de un nucleótido (T→A) en la caja TATAA (posición -28) de la región promotora de U3, pasando a generar el motivo TAAAA (ver Tabla 2.3 de Introducción). En todas las secuencias de nuestras muestras infectadas por las variantes CRF01_AE observamos dicho cambio (Figura 5.3). Además, estuvo presente en las 3 secuencias CRF11_cpx, en 2 secuencias G y 1 U (Figura 5.3). Es la primera vez que se describe este cambio en las variantes CRF11_cpx. Otra caja TATAA adicional se encontró en la posición -136 de las LTRs de la variante CRF01_AE, aunque algunos autores observaron previamente que no era funcional (Jeeninga et al., 2000).

Además, como se definió en la Tabla 2.3 de introducción, determinados subtipos presentan una secuencia específica en la región del Core-NRE (posición -163 a -174 dentro de región U3). En nuestras muestras encontramos conservadas las secuencias consenso CGCAGACACAT, TTTGAACAYAAR, CGAACACACAAA, CGAAGACACRTA en el Core-NRE de todas las muestras analizadas de las variantes C, D, CRF01_AE y CRF11_cpx, respectivamente. Sin embargo, la

secuencia específica del subtipo D y recombinante CRF01_AE observada en este estudio (Ramírez de Arellano et al., 2005), variaba en un nucleótido con respecto a la secuencia del Core-NRE publicada previamente (Naghavi et al., 1999) y es la primera vez que se describe esta secuencia específica en las variantes CRF11_cpx (Figura 5.3).

Los cambios genéticos de la región TAR fueron mayores en los subtipos A, G y recombinante CRF01_AE (Figura 5.3). Esto es debido a que el 93% de los virus con subtipo G y el 50% de los subtipos A estudiados presentaban el cambio C24T en la misma región del bucle de TAR. Esta mutación fue también encontrada en una de las muestras analizadas de los subtipos C, D y F.

Además, se encontró la delección del nucleótido T25 en la secuencia TCT implicada en la unión de Tat y localizada en el bucle de TAR (posiciones 23-25) (Figura 2.4 de la Introducción) de todas las muestras CRF01_AE y en el 60% de los subtipos A. Después de analizar la presencia de otras dos mutaciones en la región de TAR (A22G y U31C), previamente asociadas al subtipo E (Montano et al., 1998), ninguno de los dos virus con subtipo E (actual CRF01_AE) en LTR analizados en nuestro estudio presentó el cambio A22G. Sin embargo, el cambio U31C sí estaba presente, al igual que en una muestra con subtipo G y en 2 variantes CRF11_cpx.

5.2.2. Presencia de la región polimórfica MFNLP en los diferentes subtipos del VIH-1

La región del LTR que incluye la secuencia polimórfica mas frecuente (MFNLP), localizada en la posición –120 respecto al aislado HXB2 y con número de nucleótidos variable en las distintas muestras, estuvo presente en al menos una muestra de todas las variantes analizadas, excepto en las LTRs de la variante CRF01_AE (Figura 5.3). Además, encontramos un mayor número de muestras con inserciones en dicha región MFNLP en las muestras LTR con subtipo A, C, D, F, H y CRF_cpx11 respecto a aquellas que presentaban subtipo B (Figura 5.3; Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Número de muestras con inserciones en la región MFNLP en los diferentes subtipos del VIH-1 analizados.

Subtipos VIH-1 (nº muestras)	Muestras con inserciones	Nucleótidos insertados (rango)
A (10)	7	15-28
B (3)	1	28
C (6)	6	5-28
D (2)	1	22
CRF01_AE (2)	0	0
F (2)	2	21
G (16)	5	12-20
H (2)	2	29-30
CRF11_cpx(3)	3	6-19
Total (46)	27	5-30

Tabla 5.5. Variabilidad genética de la región LTR en diferentes sitios de unión de proteínas celulares y virales relevantes para la regulación transcripcional del VIH-1 en diferentes subtipos del VIH-1 en relación a su secuencia consenso.

Subtipos del VIH-1 (nº de muestras)	Frecuencia de mutación (x10 ⁻¹)												
	U3											R	
	U3/Región Moduladora						U3/Región Enhancer		U3/Core				R/TAR
	NF-AT1 (-199 a -212)	Core-NRE Total (-163 a -174)		USF (-163 a -168)	RBF-1 (-145 a -148)	LEF-1 (-131 a -136)	RBF-2 (-122 a -130)	NF-kB (II) (-99 a -109)	NF-kB (I) (-84 a -94)	SP1 (III) (-70 a -81)	SP1 (II) (-58 a -69)	SPI (I) (-46 a -57)	TATAA (-24 a -28)
B (3)	0.3	2	2.8	0	1.3	0.3	0	0	0.7	0.3	0	0	0.3
B (BD, 11) ^a	0.7	1.3	1.7	0	2.3	0.5	0	0	0.7	0.3	0.1	0	0.3
A (10)	0.9	2.6	2	0	0.4	1	0	0	1	1.6	0.6	0	0.8
C (6)	1.3	0.6	1.1	0	0	0	0	0.5	1.3	0.1	0	0	0.2
D (1)	0.8	0	0	0	2	0	0	0	3	0	1	0	0.1
CRF01_AE (2)	0	1.5	1.5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.3
F (2)	0.4	1	0.8	0	0	0.5	0.5	0	4.5	0.9	0	0	0.08
G (15)	0.8	2	2	0.4	0.6	0.4	0.1	0.06	0.9	0.8	0.2	0.2	0.5
H (2)	1.2	2.3	3	0	1	0.5	0	0	0.9	1.8	0	0	0.4
CRF11_cpx (2)	0.8	0.7	0.8	0	1	0	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0	0.4

^a BD, secuencias con subtipo B obtenidas de la base de datos de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>). Todas las secuencias con subtipo B fueron alineadas con la secuencia de referencia del aislado HXB2.

5.3. Variabilidad genética intrasubtipo de la región LTR

La frecuencia de mutante en determinados sitios importantes para la regulación de los genes de las distintas variantes del VIH-1, se calculó con respecto a sus secuencias consensos correspondientes, como se explica en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos. Así, se determinó la variabilidad genética intrasubtipo y se comparó entre las diferentes variantes del VIH-1.

La variabilidad genética intrasubtipo de la región LTR fue muy baja en todas las variantes analizadas, existiendo un alto grado de conservación intrasubtipo en todos los sitios analizados importantes para la transcripción viral (Tabla 5.5). Al comparar la variabilidad genética entre las diferentes variantes, observamos que fue similar en la mayoría de los sitios reguladores del LTR analizados, siendo los sitios RBE (sitios de unión del factor RBF), NF- κ B, Sp1 (I, II) y TAR los menos variables en todas las variantes (Tabla 5.5). Por el contrario, los sitios Sp1 (III), LEF-1, Core-NRE y NF-AT fueron los más variables. Aunque la variabilidad intrasubtipo de ciertas variantes no-B fue mayor que en cepas B en los sitios NF-AT, core-NRE, Sp1(II, III) y TAR, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de mutante de los sitios reguladores analizados entre las distintas variantes (Tabla 5.5).

5.4. Variabilidad genética de la región LTR en los pacientes con progresión lenta de la enfermedad

Como se expuso en el apartado 4.1, y dado que se disponíamos de muestras de pacientes con diferente grado de progresión de la enfermedad, nos propusimos ver si existían diferencias en la variabilidad genética de sus LTRs en comparación con pacientes con progresión típica de la enfermedad.

El subtipo genético de los VIH-1 que infectaron a los pacientes LTNP (n=17) y TP (n=15) fue el B. La frecuencia de mutante en la mayoría de los sitios reguladores del LTR fue similar cuando comparamos los tres grupos de pacientes (NP, SP y TP), siendo los sitios RBF, NF- κ B y TAR los más conservados (Tabla 5.6). Por el contrario, los sitios LEF-1, USF y Sp1 fueron los más variables. Así, el sitio USF (posición -174 a -163 del LTR), presente en los virus con subtipo B y activador de la transcripción en células T, estaba 3 veces más conservado en los pacientes LTNP que en los pacientes TP (5×10^{-2} vs. 14.4×10^{-2} ; $p=0.02$). Sin embargo, la frecuencia de mutante de los dos primeros sitios Sp1 (I, II), ricos en GC, fue significativamente mayor en los virus de los pacientes LTNP comparado con los virus de los pacientes TP [4.1×10^{-2} vs. 0.6×10^{-2} para el sitio Sp1 (I), $p=0.04$; y 7.5×10^{-2} vs. 2.4×10^{-2} para el sitio Sp1 (II), $p=0.03$] (Tabla 5.6). Esto fue debido fundamentalmente a cambios a A/T presentes mayoritariamente en los virus de los pacientes NP.

Tabla 5.6. Variabilidad genética del LTR en diferentes sitios de unión de proteínas celulares y virales relevantes para la regulación transcripcional del VIH-1 en individuos con diferente grado de progresión de la enfermedad.

Nº de muestras	Frecuencia de mutante ($\times 10^{-2}$)											
	U3											R
	U3/Región moduladora					U3/Región enhancer		U3/Core				R/TAR
	Core-NRE	USF	RBF-1	LEF-1	RBF-2	NF-kB(II)	NF-kB(I)	SP1(III)	SP1(II)	SP1(I)	TATAA	TAR
	Total (-174 to -163)	(-168 to -163)	(-148 to -145)	(-136 to -131)	(-130 to -122)	(-109 to -99)	(-94 to -84)	(-81 to -70)	(-69 to -58)	(-57 to -46)	(-28 to -24)	(+1 to +60)
SP (6)	5.1	5.5	0	33	0	0	0	8.3	4.5	1.6	0	0.3
NP (11)	6.3	4.5	0	30	2.2	2.7	3.3	8	9	5.5	0	1.8
Total LTNP (17)	5.8	5	0	31	1.4	1.6	2.1	8.2	7.5	4.1	0	1.3
TP (15)	2	14.4	0	12.2	3.3	2	0.6	7.3	2.4	0.6	0	1.2

LTNP, *long-term non-progressors*; NP, no progresores; SP, progresores lentos; TP, progresores típicos.

En rojo, la frecuencia de mutante con diferencias significativas entre los virus de los pacientes LTNP vs. TP (sitios USF y SP1 (I y II)).

La variabilidad genética entre los pacientes NP y SP fue similar en la mayoría de los sitios reguladores del LTR excepto para los sitios Sp1 (I, II). Así, los virus pertenecientes a los pacientes NP presentaron una mayor frecuencia de mutante en los sitios Sp1 (I y II) que los virus de los pacientes SP. Este incremento fue debido fundamentalmente al alto contenido en nucleótidos A/T (Figura 5.4).

Figura 5.4. Secuencia del sitio Sp1 (I, II, III) de los virus que infectan a los pacientes TP, NP y SP respecto a la secuencia de referencia Sp1 del aislado HXB2.

	Sp1(III)	Sp1(II)	Sp1(I)
HXB2 . B	AGGCGTGG-CCT	TGGGCGGGACT	GGGG-AGTGGC
TP1---
TP2C.....--
TP3T.....--
TP4T.....C.....A.....
TP5T.....G--
TP6-T.....-
TP7-A.....-
TP8-A.....A.....-
TP9-T.....--
TP10---
TP11---
TP12---
TP13---
TP14AA.....--
TP15A.....--
NP1T.....--A.....-
NP2-A.....-
NP3A.....GC.....A.....-A.....-
NP4T.....-T.....A.....-
NP5---
NP6T.....-A.....T.....A.....AAA.....-
NP7-A.....T.....A.....GA.....-
NP8-T.....A.....-
NP9-T.....A.....-
NP10C.....-A.....-T.....
NP11T.....---
NP12---
SP13---
SP14-T.....G.....T.....
SP15-A.....--
SP16-T.....-
SP17C.....-T.....G.....
SP18T.....---
SP19-T.....G.....
SP20-A.....--

TP, numeración de los pacientes de acuerdo a la cohorte de Visco-Comandini (Visco-Comandini et al., 1999).

NP y SP, numeración de los pacientes de acuerdo a la referencia de Rodés (Rodes et al., 2004).

5.5. Funcionalidad de los diferentes promotores LTRs de las distintas variantes del VIH-1 en células Jurkat

Mediante los ensayos de transfección se comparó la actividad transcripcional basal e inducida por la proteína viral Tat de los promotores LTRs de los distintos subtipos del VIH-1 en presencia y ausencia del estímulo PMA. Para ello, se transfectaron en células Jurkat los vectores plasmídicos de expresión recombinantes que incluían las secuencias U3+R del LTR de los diferentes subtipos del VIH-1 que fueron clonados, tal y como se explicó en el apartado 4.7. La secuencia LTR de los clones moleculares seleccionados que se ensayaron en el estudio funcional fue similar a la secuencia de su nested-PCR inicial (excepto para la muestra nº 20) y se muestra en azul en la Figura 5.3. Mediante este tipo de construcciones, la transcripción del gen marcador, en nuestro caso el gen de la luciferasa, se encuentra bajo el control del promotor LTR del VIH (Figura 4.1). La medida de la actividad enzimática de la luciferasa tras añadir su sustrato (luciferina) refleja la actividad transcripcional del LTR expresada en unidades relativas de luciferasa (URLs) totales.

En la línea celular Jurkat, la actividad transcripcional tanto basal como inducida por PMA o por la proteína viral Tat de las diferentes LTRs clonadas, pudo ser analizada en todos los casos, como se muestra en la Tabla 5.7. En ella se indican los incrementos de actividad transcripcional en relación a la actividad basal (valor 1) de cada una de las muestras analizadas. Dicha actividad transcripcional fue debida a una interacción eficaz de los factores celulares implicados en la activación de la transcripción viral con las secuencias reguladoras del LTR (Jones et al., 1986; García et al., 1987; García et al., 1988; Harrich et al., 1989; Alcamí et al., 1995). Por tanto, los resultados obtenidos indicaron que la mayoría de las secuencias LTR

analizadas fueron funcionales, excepto dos de las secuencias LTR clonadas (mostradas en rojo en la Tabla 5.7) que estaban hipermutadas y no dieron actividad transcripcional.

Tabla 5.7. Incrementos de actividad transcripcional en relación a la actividad basal (valor 1) de cada una de las muestras LTR analizadas.

Variantes del VIH-1	nº de muestra ^a	Nº de réplicas por muestra	Incrementos de actividad transcripcional			
			Basal	Basal+PMA	Tat	Tat+PMA
B	HXB2	4	1	7	36	138
A	5		1	3	44	152
	6		1	3	24	94
	8		1	6	47	59
C	17		1	10	33	121
	19		1	4	24	57
D	20		1	4	1	3
	48		1	2	32	48
E (CRF01_AE)	21		1	4	21	62
	22		1	2	37	91
F	23		1	9	57	262
	24		1	3	23	62
G	30		1	4	33	159
	31		1	6	10	56
	37		1	5	2	2
H	41		1	5	4	30
	42		1	2	32	64
CRF11_cpx	43		1	7	40	131
	44		1	2	9	22

a, con respecto a la Tabla 5.1.

En rojo se muestran los valores de dos promotores LTR cuyas secuencias estaban hipermutadas.

En la Figura 5.5 se muestran los niveles actividad transcripcional media, tanto basal como inducida por PMA o Tat entre las muestras LTR con igual subtipo genético, mostrando igualmente que todos los promotores fueron funcionales. Todos presentaban una mayor actividad relativa a su basal cuando eran inducidos por el estímulo celular PMA o la proteína viral Tat.

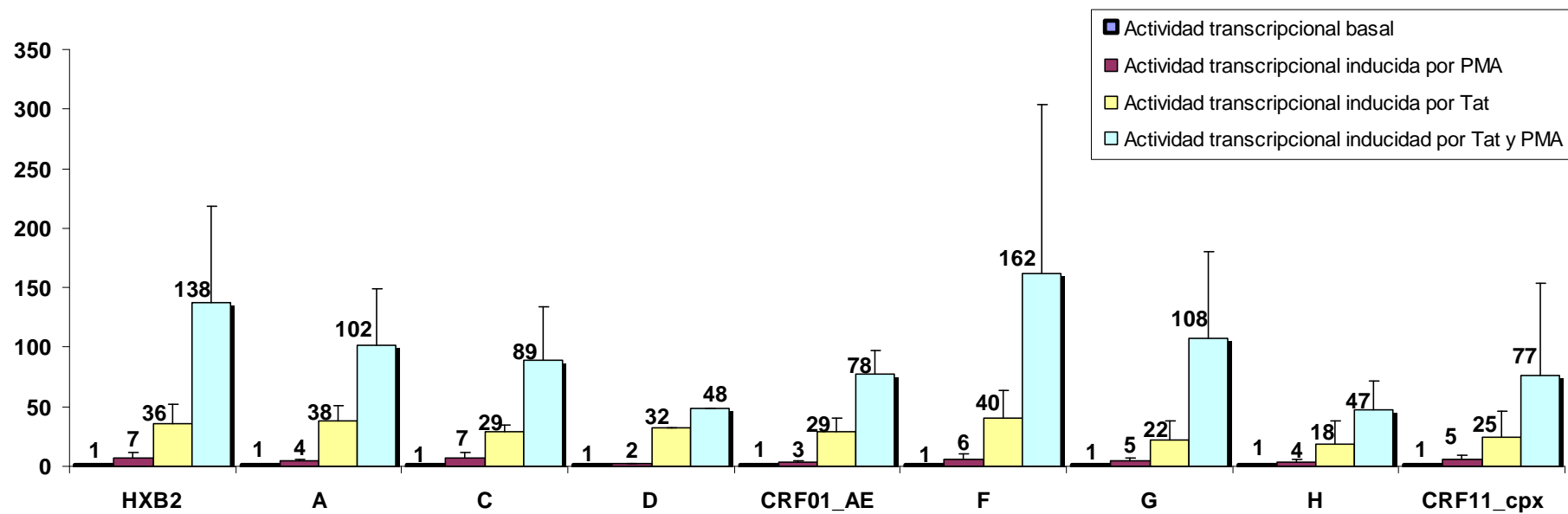


Figura 5.5. Incrementos de actividad media basal e inducida por Tat en presencia y ausencia de PMA entre las muestras con igual subtipo genético, relativos al valor 1 asignado a la actividad basal de cada subtipo. Se representa la desviación estándar de la media, excepto para la muestra con subtipo D, al excluirse la otra muestra con subtipo D por estar hipermutada (nº 20).

5.6. Actividad basal e inducida por PMA en los promotores LTR de las distintas variantes del VIH-1

Los niveles de actividad transcripcional inducida por PMA del LTR de las distintas variantes del VIH-1 analizados fueron mayores en relación a la actividad basal de cada subtipo (valor 1), observando un incremento de 2 a 7 veces (Figura 5.5). Cuando comparamos dicha actividad media inducida por PMA entre los diferentes subtipos, observamos un incremento similar de actividad con respecto a la basal en la mayoría de los subtipos analizados (Figura 5.5) a pesar de existir cambios genéticos en las LTRs de las distintas variantes en sitios importantes para la regulación de la transcripción viral (Figura 5.3). Cuando expresamos la media de actividad basal e inducida por PMA de los diferentes promotores LTR en valores de URLs totales (Figura 5.6), observamos que el promotor LTR con subtipo C presentaba una mayor actividad que el resto de promotores analizados (Figura 5.6). Sin embargo, la actividad basal e inducida con PMA del promotor LTR con subtipo D presentó una menor actividad, como se observó al comparar los incrementos de actividad con respecto a su basal (Figura 5.6).

En cuanto a la media de actividad basal e inducida por PMA de los diferentes promotores relativas al valor de la actividad basal del promotor del HXB2 (valor 1), las variantes C y CRF01_AE mostraron una mayor actividad transcripcional tanto basal como inducida por PMA y el subtipo D una menor actividad inducida por PMA (Figura 5.7).

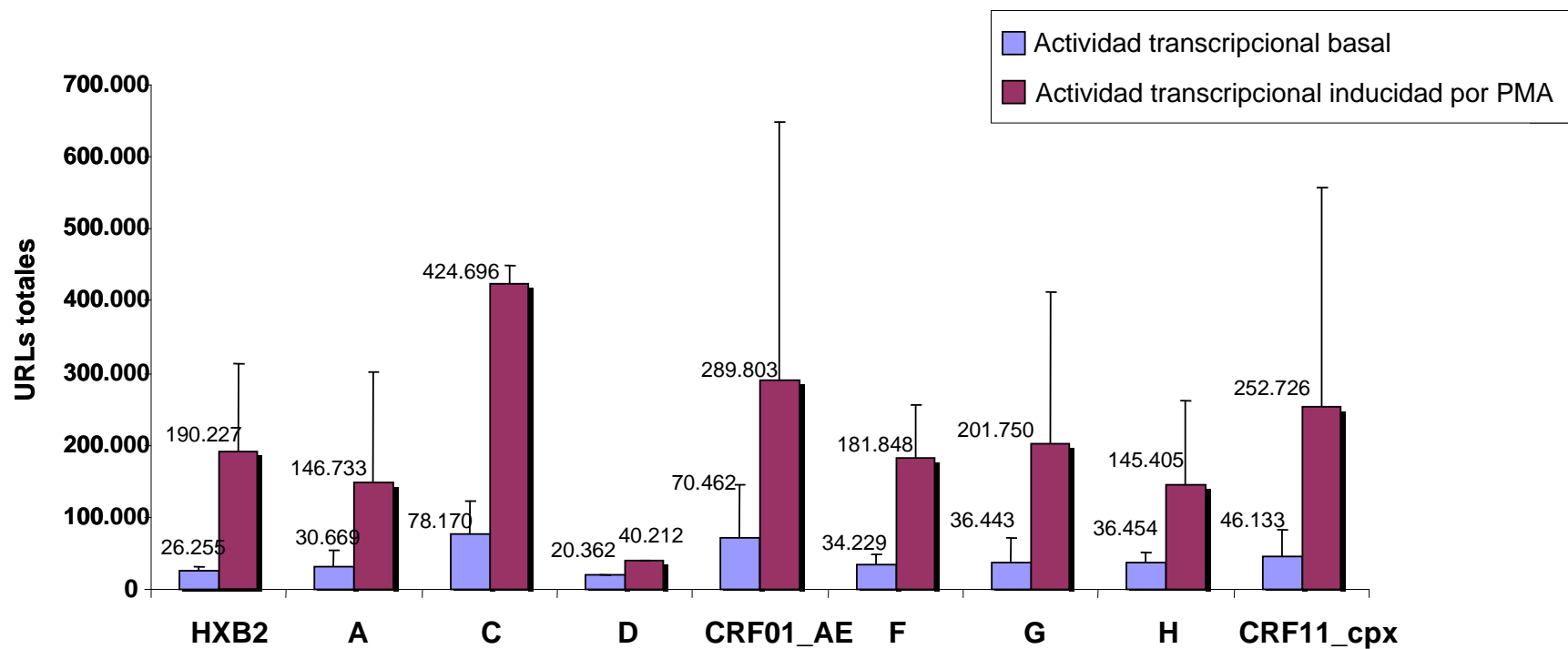


Figura 5.6. Valores medios de actividad transcripcional basal e inducida por PMA del LTR entre las muestras con igual subtipo genético expresadas en URLs (unidades relativas de luciferasa) totales. Se representa la desviación estándar de la media, excepto para una de las muestras con subtipo D, por estar hipermutada (nº 20).

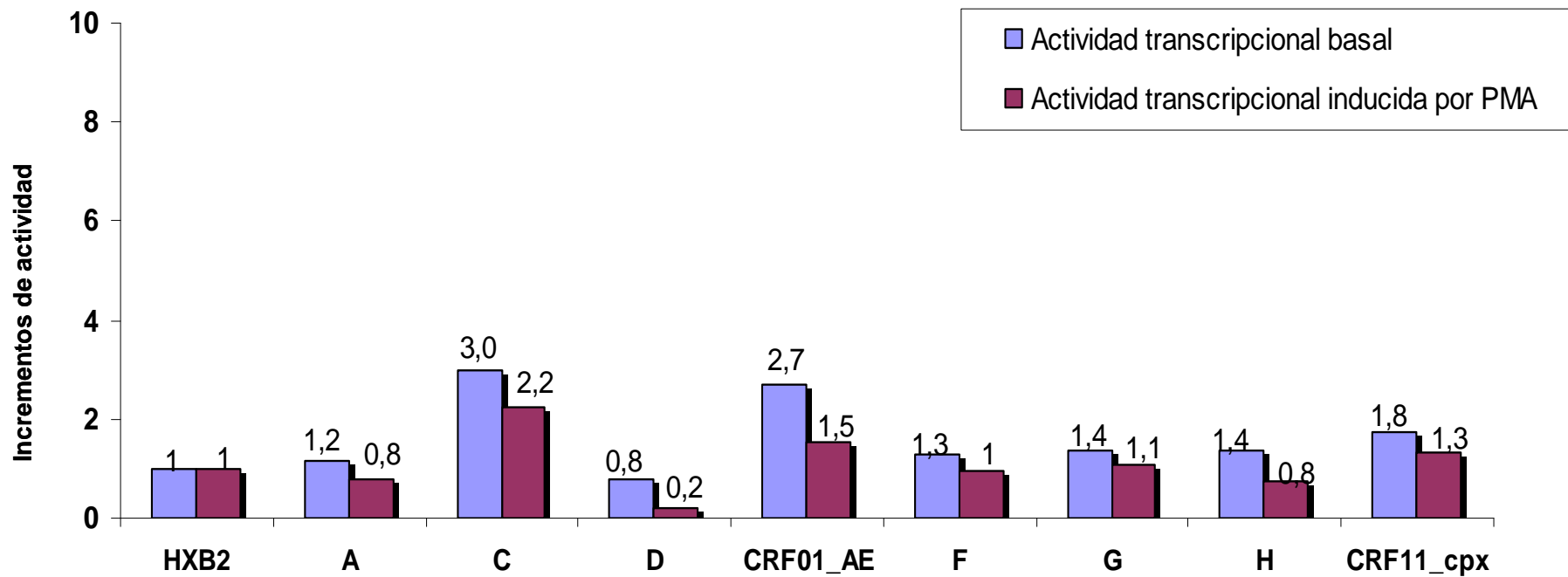


Figura 5.7. Valores medios de actividad transcripcional basal e inducida por PMA del LTR entre las muestras con igual subtipo genético, expresados en incrementos de URL (unidades relativas de luciferasa) relativos al valor 1 asignado a la actividad basal e inducida del HXB2.

5.7. Actividad inducida por Tat en los promotores LTR de las distintas variantes del VIH-1

Como se muestra en la Figura 5.5, la expresión de la proteína Tat en la línea celular Jurkat indujo la transactivación de todos los promotores LTR del VIH de todos los subtipos analizados, incrementándose entre 47 y 162 veces de media en relación a la actividad transcripcional basal correspondiente. Además, y como era de esperar, en presencia de la proteína viral Tat con y sin PMA, se observaron los mayores incrementos de actividad transcripcional en todos los promotores LTRs de las diferentes variantes de manera similar. Por tanto, se produjo un efecto sinérgico entre la activación celular y la proteína viral Tat (Figura 5.8 y 5.9).

Sin embargo, al analizar la actividad media inducida por Tat, tanto en ausencia como en presencia de PMA, de los promotores LTR con subtipo D y H, se observaron menores incrementos de actividad en relación a su actividad basal, cuando se compararon con la actividad inducida por Tat del resto de los promotores (Figura 5.8 y 5.9). En ningún caso, estas variaciones en la actividad se pudieron explicar por la existencia de mutaciones específicas en el sitio de unión de la proteína viral Tat de la región TAR del LTR que pudieran modificar la afinidad unión (Figura 5.3).

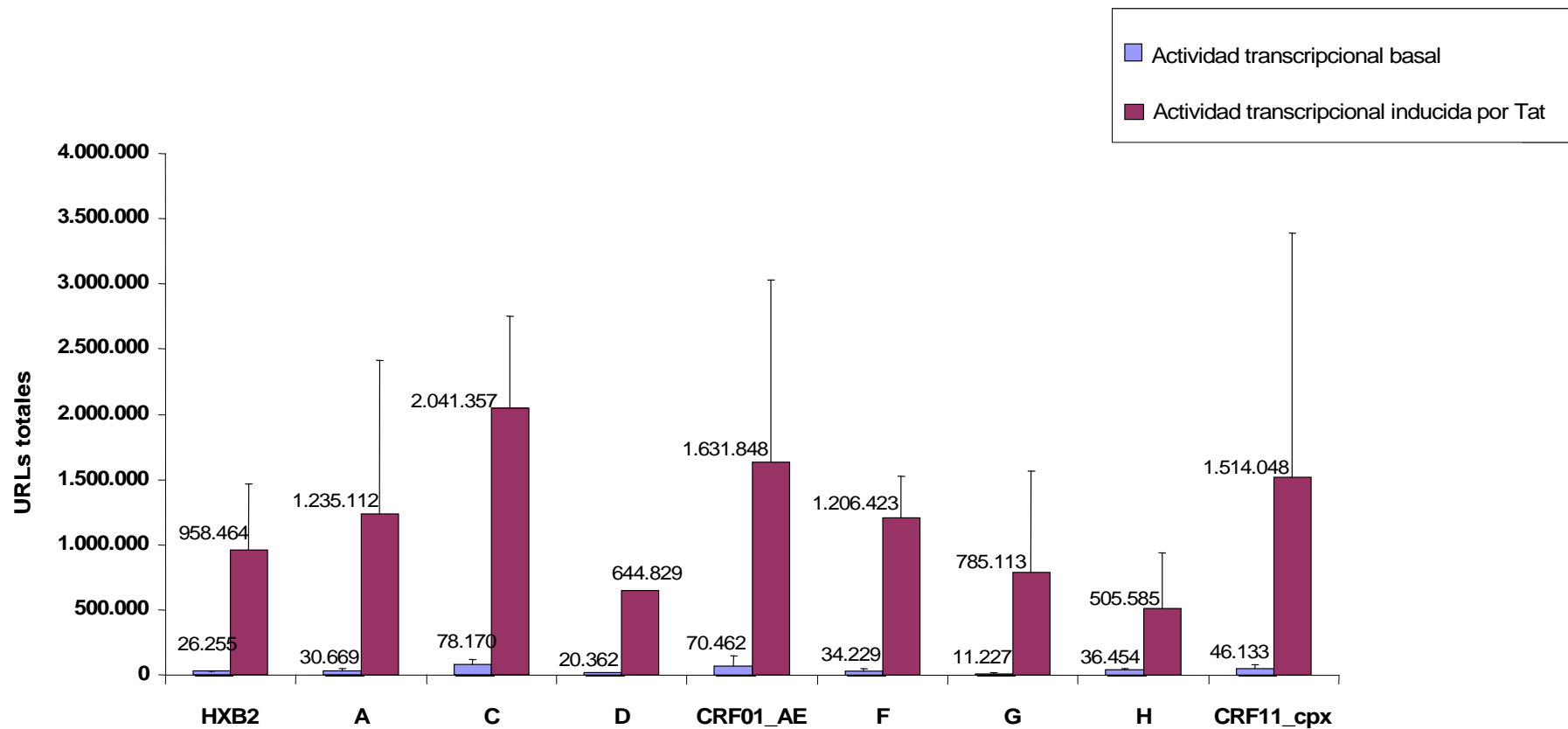


Figura 5.8. Valores medios de actividad transcripcional basal e inducida por Tat del LTR entre las muestras con igual subtipo genético expresadas en URLs (unidades relativas de luciferasa) totales. Se representa la desviación estándar de la media, excepto para una de las muestras con subtipo D, por estar hipermutada (nº 20).

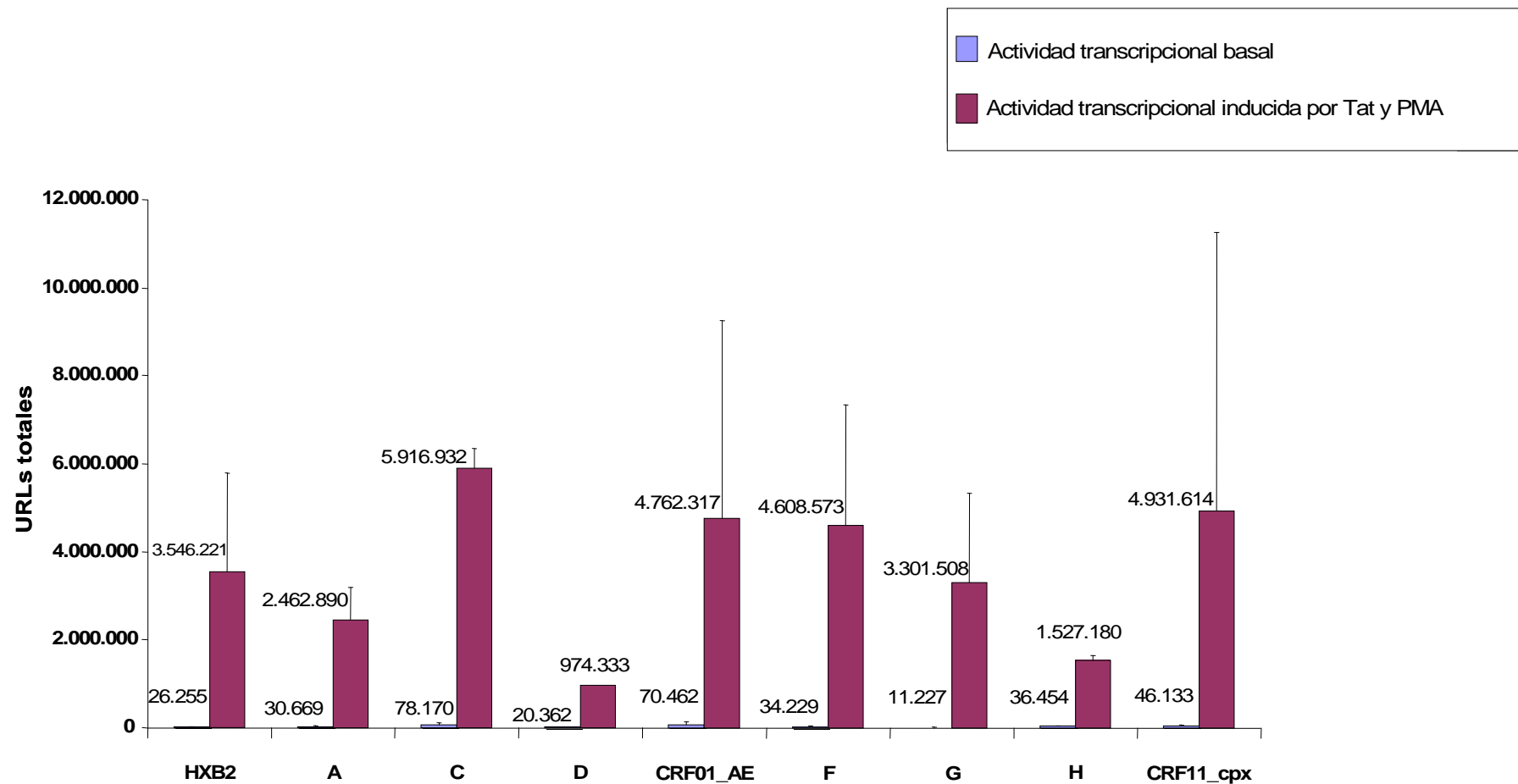


Figura 5.9. Valores medios de actividad transcripcional basal e inducida por Tat y PMA del LTR entre las muestras con igual subtipo genético expresadas en URLs (unidades relativas de luciferasa) totales. Se representa la desviación estándar de la media, excepto para una de las muestras con subtipo D, por estar hipermutada (nº 20).

5.8. Actividad transcripcional de los promotores LTR hipermutados

Tras analizar las secuencias LTR de las diferentes variantes, observamos algunos promotores con múltiples cambios del nucleótido guanina (G) a adenina (A) en sitios importantes para la regulación de la actividad del promotor LTR (Figura 5.3, secuencias señaladas en rojo, pacientes 37 y 45). La secuencia LTR del paciente 37 fue amplificada como se describió en el apartado 4.7.1., llevando a cabo su clonaje y seleccionando 3 clones moleculares del mismo (clones 37.1, 37.2 y 37.3, Figura 5.10).

La disponibilidad de muestras secuenciales en el tiempo del paciente nº 37, infectado por el virus hipermutado del subtipo G, nos permitió amplificar la región LTR del virus en diferentes momentos de la infección del paciente. Así, se pudo clonar la secuencia LTR “salvaje” (wt) del paciente (primera muestra del paciente, naive sin tratamiento antirretroviral, con carga viral alta), y ensayar la actividad transcripcional del LTR antes de aparecer esa hipermutación. Además, también se ensayó funcionalmente la actividad del LTR en un clon molecular perteneciente a otra muestra posterior, parcialmente hipermutada, con un menor número de cambios de guanina (G) a adenina (A) en su secuencia LTR (Figura 5.10). En este momento, el paciente estaba en tratamiento antirretroviral de gran eficacia (TARGA) y su carga viral era indetectable (<50 copias ARN/ml), igual que en el momento en que la muestra hipermutada (37.1) fue analizada genéticamente.

Además, se obtuvieron clones moleculares hipermutados de la región LTR pertenecientes a dos muestras secuenciales del paciente nº 20 (clones 20.1 y 20.2, Figura 5.9), ensayándose funcionalmente la actividad de dicho promotor. El paciente estaba con TARGA y la carga viral de ambas muestras era indetectable (<50 copias ARN/ml). No se pudo obtener ninguna secuencia “salvaje” clonada de dicho paciente, a pesar de que en su secuencia consenso no se obtuvo esa hipermutación.

Los vectores recombinantes generados con las secuencias LTR hipermutadas de los virus nº 20 y 37 fueron transfectados en células Jurkat, cuantificando la actividad luciferasa expresada bajo la acción promotora de las diferentes LTR hipermutadas. Se observó que dichos promotores LTR no eran inducidos ni por PMA ni por la proteína viral Tat.

Así, se observó un menor incremento de actividad transcripcional inducida por PMA y/o Tat de dichos los promotores LTR hipermutados (muestras 20 y 37) y del promotor hipermutado parcial (muestra 37) en relación a la actividad basal de cada uno, en comparación tanto de la actividad del promotor “salvaje” no hipermutado del paciente nº 37 con subtipo G como la del aislado HXB2 (Figura 5.11).

Los resultados obtenidos con las secuencias LTR hipermutadas demuestran que un alto grado de variabilidad genética en las secuencias promotoras del LTR debida a cambios del nucleótido G a A en sitios importantes para la regulación de la transcripción viral podría comprometer la actividad de dicho promotor. Se disminuiría así la transcripción de los genes del VIH-1, y por tanto, la capacidad replicativa de

dichos virus. Esto se podría ver reflejado a nivel clínico en una disminución de la carga viral en las muestras de dichos pacientes infectados por los virus hipermutados. Sin embargo, cuando evaluamos esa posibilidad con los datos clínicos disponibles de carga viral en esas muestras secuenciales, no pudimos ver dicho efecto, ya que los pacientes se encontraban tomando tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA), y por tanto, dichas muestras presentaban cargas virales indetectables.

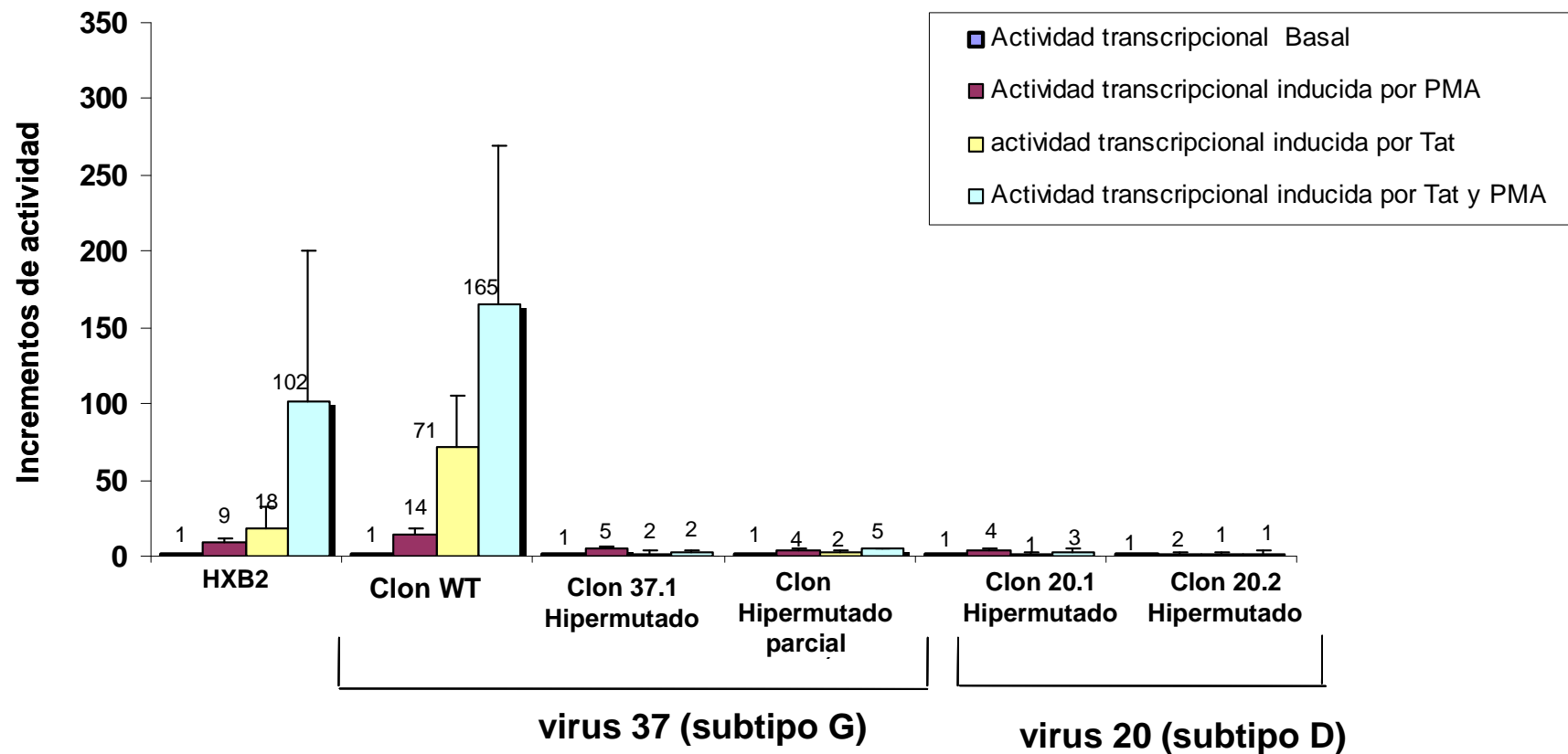


Figura 5.11. Transactivación de las secuencias LTR hipermutadas de los subtipo G y D en la línea celular Jurkat mediante activación celular y expresión de la proteína Tat, en comparación con a la actividad del promotor LTR “salvaje” (WT) del paciente nº 37 y del HXB2. Se representa la desviación estándar de la media de los ensayos por cuadruplicado. Las URLs (unidades relativas de liciferasa) se expresaron en incrementos relativos al valor 1 asignado a la actividad basal de cada muestra.

6. Discusión

Las posibles diferencias biológicas entre las distintas variantes del VIH-1 del grupo M descritas en la literatura podrían ser debidas a cambios genéticos en su promotor LTR. Hipotéticamente, podrían afectar la actividad transcripcional de sus genes. El primer objetivo de esta Tesis fue caracterizar dicha región en la mayoría de los subtipos descritos del VIH-1. Además, como determinadas mutaciones y deleciones en dichos promotores se han asociado con una progresión lenta de la enfermedad, estudiamos la variabilidad genética de dicha región en la cohorte de pacientes LTNP del Hospital Carlos III.

Dado que los mecanismos reguladores del inicio y elongación de la transcripción de los genes del VIH actúan sobre las secuencias localizadas en la región promotora del LTR, pusimos a punto la técnica de amplificación y clonaje molecular de dicha región en vectores plasmídicos de expresión que contienen el gen luciferasa como marcador para poder medir su actividad. El motivo para seleccionar este marcador fue su mayor sensibilidad respecto a otros (Schwartz et al., 1990). Se sabe que la transcripción de los genes del VIH se produce en un estado de activación celular del linfocito CD4+ y que para ser eficiente es necesaria la presencia de la proteína viral Tat (Gatignol et al., 1991; Gaynor, 1995). Por ello, estudiamos la actividad transcripcional viral promovida por el promotor LTR *in vitro* inducida por un estímulo celular y en presencia de dicha proteína viral en todos los clones recombinantes seleccionados que incluían secuencias LTR de las distintas variantes del VIH-1.

6.1 Clasificación de las diferentes variantes del VIH-1 mediante análisis filogenético de la región LTR

Las primeras clasificaciones de subtipos del VIH-1 se basaron en el análisis filogenético de las secuencias que codificaban para el gen de la *envuelta* (*env*). Sin embargo, la región codificante del gen de la *polimerasa* (*pol*) ha sido también validada para este propósito (Hue et al., 2004) y actualmente es la más utilizada. Ello se debe a la disponibilidad de esas secuencias para los análisis de resistencias a fármacos antirretrovirales en pacientes VIH positivos en los centros de seguimiento clínico. En nuestro estudio, la clasificación de las diferentes variantes se llevó a cabo mediante el análisis filogenético de la región LTR. Ello se consiguió mediante el diseño optimizado de nuevos cebadores específicos (ver apartado 4.3.1) para la amplificación de dicha región en las diferentes variantes del VIH-1. Mediante el alineamiento junto con secuencias de referencias del GenBank, se obtuvo el subtipo genético de todas las muestras. El método de subtipaje genético de las mismas mediante análisis filogenético de la región LTR fue válido para clasificar las diferentes variantes del VIH-1.

Para la amplificación de la región LTR de los pacientes LTNP también se llevó a cabo el diseño de nuevos cebadores específicos para dichas secuencias (ver apartado 4.3.2).

6.2. Recombinación entre las regiones LTR y PR

Se sabe que la recombinación es frecuente en zonas donde circulan simultáneamente cepas virales de diferentes subtipos. Así, el alto grado de recombinación observado en la región LTR/PR (37%) de nuestras muestras refleja la existencia de varias cepas no-B circulando simultáneamente en la zona geográfica de origen de los pacientes donde probablemente se infectaron. Es importante destacar que una gran parte de los sujetos estudiados procedían de África Subsahariana, donde casi todas las variantes del VIH circulan (Janssens et al., 1997). Se estima que el número de variantes recombinantes que tienen secuencias de subtipos distintos en el mismo genoma irá aumentando en la pandemia, si se analizan distintos genes de la misma muestra o fragmentos más largos del genoma (Holguín et al., 2005a).

No podemos descartar que el porcentaje de recombinantes pudiera aumentar al analizar otros genes de los virus que infectaron nuestros pacientes. Otros datos de nuestro grupo demuestran que la frecuencia de recombinación intersubtipo es alta, como lo refleja el análisis de los genes *pol* y *env* (Lospitao et al., 2005; Holguín et al., 2005b) o de la región de *gag* y *pol* (Holguín et al., 2005a) en muestras clínicas del Hospital Carlos III. Incluso recientemente se han identificado en nuestro país las primeras recombinaciones entre 2 CRFs diferentes con estructuras mosaico complejas (Holguín et al., 2007).

6.3 Variaciones genéticas específicas de subtipo en la región LTR

Para estudiar la variabilidad genética de la región LTR en las diferentes variantes no-B del VIH-1, se calculó la frecuencia de mutante en relación a la secuencia consenso de cada variante, lo cual supone una novedad respecto a los estudios anteriores que no realizaban este tipo de análisis. Además, en nuestro estudio se incluyeron un gran número de secuencias con subtipo no-B del VIH-1 y algunas formas recombinantes intersubtipo.

Al igual que observaron estudios previos (Montano et al., 1997; Montano et al., 1998; Naghavi et al., 1999; De Baar et al., 2000; Ramírez de Arellano et al., 2005), la región LTR de los diferentes subtipos no-B del VIH-1 presentó un alto grado de variabilidad genética en algunas de las regiones reguladoras, potenciadora, del core y TAR en relación a la secuencia LTR de referencia del aislado HXB2. El alto grado de variabilidad encontrado en determinadas regiones del promotor LTR es probablemente debido a que muchos de los cambios encontrados son patrones de secuencias específicos que se repiten en todas las muestras analizadas con igual subtipo genético. Este fue el caso de los sitios NF- κ B, Core-NRE, la región TATA y TAR, como se describió en el apartado 5.2.1 de Resultados.

Los cambios genéticos observados a lo largo de la región LTR en las diferentes variantes del VIH-1 podrían modificar la interacción de determinados factores celulares y virales de transcripción con dichas secuencias, pudiendo afectar al nivel de actividad transcripcional, y por tanto, al grado de replicación viral de

dichas variantes. Sin embargo, no todos los cambios podrían tener la misma repercusión biológica, pudiendo ser una proporción de ellos reflejo de una tolerancia estructural. Además, la actividad transcripcional de un determinado promotor, con cambios específicos en sus secuencias, podría estar condicionada por la expresión de diferentes factores celulares en las distintas células del individuo infectado.

Observamos una baja variabilidad genética intrasubtipo (establecida en relación a la secuencia consenso de cada variante) en la mayoría de los sitios importantes del LTR para la unión de factores celulares para la transcripción viral (Tabla 5.5). Esto sugiere que los cambios específicos de subtipo se mantuvieron en todas las muestras analizadas y, por tanto, podrían establecerse como marcadores específicos de determinadas variantes.

Una limitación del estudio es el número de muestras representativo de cada variante estudiada. La razón es que la mayoría de las muestras con seguimiento clínico en el Hospital Carlos III presentaban subtipo B del VIH-1 (el más prevalente en España y el resto de países industrializados). Por ello, no se pudo ampliar el número de muestras infectadas por ciertas variantes no-B del VIH-1.

6.4. Frecuencia de mutante en los sitios Sp1 (I y II) en virus de pacientes progresores lentos

Al igual que algunos estudios anteriores (Quinones-Mateu et al., 1998; Visco-Comandini et al., 1999), no observamos diferencias significativas en la frecuencia de mutante en la mayoría de los sitios reguladores del LTR cuando comparamos los

virus de los pacientes LTNP vs. TP. Sin embargo, si observamos una variabilidad genética significativamente mayor en los dos primeros sitios Sp1 (I, II), ricos en GC, en virus de pacientes LTNP (mayoritariamente en pacientes NP) vs TP, debida a cambios A/T (Figura 5.4).

Dado que el alto contenido en nucleótidos G/C es requerido en el sitio de unión del factor celular Sp1 (Kadonaga et al., 1987), el elevado contenido en nucleótidos A/T presente en los virus LTNP (particularmente en NP) podría disminuir la afinidad de unión de dicho factor, esencial para la activación transcripcional (Jones et al., 1986), y por tanto, contribuir a una reducción de la transcripción viral en los virus de dichos pacientes. En este sentido, un estudio previo encontró disminuida la actividad del promotor LTR de un paciente LTNP que presentaba múltiples cambios del nucleótido G a A en los sitios Sp1 del LTR (Zhang et al., 1997a).

Aunque se podría esperar una mayor variabilidad genética en determinadas regiones del LTR en pacientes LTNP debido a que llevan más tiempo infectados por el VIH, algunos sitios reguladores como USF presentaron una variabilidad genética significativamente menor en los pacientes LTNP vs. TP (Tabla 5.6). En el resto de sitios, la variabilidad genética fue similar en todos los grupos de pacientes.

El que estudios previos no encontraran ninguna relación entre la variabilidad genética del LTR y el grado de progresión, podría ser debido a diferencias en la población examinada. Mientras que otros autores estudiaron dicha variabilidad en pacientes LTNP, nuestro estudio es el primero que examina la variabilidad genética del LTR en pacientes LTNP estratificados en dos grupos: SP y NP (Ramírez de

Arellano et al., 2006a). Estas dos categorías de pacientes presentan diferente progresión clínica después de un largo periodo de seguimiento, como ha sido previamente demostrado (Rodes et al., 2004).

Se requiere un mayor número de pacientes con distinto grado de progresión para poder confirmar las diferencias genéticas encontradas en las secuencias LTR de nuestro estudio. Sin embargo, el porcentaje de pacientes que cumplen los criterios de LTNP en el total de la población de individuos VIH+ está entre un 1-5%. Así, sólo 17 pacientes de un total de 2.300 individuos VIH-1+ con seguimiento clínico regular en nuestro hospital cumplen los criterios de LTNP, y todos fueron incluidos en nuestro estudio.

Además, para poder atribuir cambios específicos en el LTR con la pérdida o disminución de su actividad transcripcional, se requieren ensayos funcionales con clones moleculares mutados en determinadas posiciones del LTR.

6.5. Actividad transcripcional “*in vitro*” en los promotores LTR de diferentes variantes del VIH-1

Para estudiar el comportamiento del promotor LTR en las diferentes variantes del VIH-1 *in vitro*, escogimos la línea celular linfoblastoide T Jurkat, por ser una línea celular estable, de rápido crecimiento y buena eficacia de transfección mediante electroporación. Los parámetros de transfección fueron optimizados en experimentos previos con distintos vectores de expresión de luciferasa y la LTR del VIH-1, presentando buenos niveles de expresión. La normalización del número de células usadas en cada transfección se efectuó incluyendo otro vector (pSV- β -

galactosidasa), cuya expresión se detectó por la presencia de β -galactosidasa. Este método resultó ser bueno para normalizar todos los ensayos.

La mayoría de los trabajos anteriores compararon la actividad transcripcional de los promotores LTR de las variantes B, C, D y CRF01_AE del VIH-1 (Montano et al., 1997; Montano et al., 1998; Naghavi et al., 1999; Roof et al., 2002). Sin embargo, este es el primer trabajo que analiza la actividad transcripcional del LTR en un mayor número de muestras y con representación de la mayoría de los subtipos del VIH-1 y algunas variantes recombinantes.

Todos los promotores LTR de los subtipos analizados fueron funcionales, presentando una baja actividad basal, que fue fuertemente inducida cuando se estimuló en presencia de PMA o PMA junto con la proteína viral Tat. Esto confirma el efecto sinérgico existente entre la proteína Tat y la activación celular. Además, al igual que se ha sugerido en estudios previos (Naghavi et al., 1999; Jeeninga et al., 2000), todos los promotores analizados fueron inducidos con la proteína Tat del subtipo B, siendo funcional en todas las variantes analizadas.

6.5.1. Basal

Se encontraron diferencias en los niveles de actividad basal de los promotores C y CRF01_AE, estando cerca de 3 veces incrementada en relación a la actividad basal de HXB2, como se demuestra en la Figura 5.7. Los resultados obtenidos en relación al promotor C podrían ser debidos a la presencia de sus tres sitios NF- κ B, lo que se ha correlacionado en estudios anteriores con una mayor

actividad transcripcional basal *in vitro* (Montano et al., 1997; Naghavi et al., 1999). Estos resultados se confirmaron con estudios *in vivo*, donde una quimera recombinante con LTR del subtipo C fue la variante predominante y, por tanto, la mejor adaptada en determinados tejidos celulares durante la primoinfección por VIH-1 (Centlivre et al., 2005; Centlivre et al., 2006).

En relación al promotor CRF01_AE, existen estudios previos que también mostraron una mayor actividad transcripcional basal *in vitro* en relación al resto de promotores analizados de subtipos A, B, C y G (Jeeninga et al., 2000), a pesar de presentar un único sitio NF- κ B y mostrar diferencias genéticas en otras regiones del LTR con respecto a otros subtipos (ver Tabla 2.3 de Introducción). Sin embargo, no siempre una mayor variabilidad en el LTR tendría que implicar una mayor actividad del promotor, ya que ello depende de cómo afectan estos cambios a la unión de factores activadores o represores de la actividad transcripcional.

6.5.2. Inducida por PMA

En cuanto al nivel de actividad transcripcional inducida por un estímulo celular, estudios previos correlacionaron el nivel de actividad inducida por TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral) con el número de sitios NF- κ B (Montano et al., 1998; Jeeninga et al., 2000). Así, aquellas secuencias promotoras con mayor número de sitios NF- κ B presentaron mayores incrementos de actividad.

Utilizando PMA como estímulo inductor de la actividad transcripcional, observamos también dicha correlación en el promotor con subtipo C (3 sitios NF- κ B).

Sin embargo, el promotor CRF01_AE, a pesar de presentar un único sitio NF- κ B, no presentó una menor actividad inducida por PMA (ver Figura 5.6 y 5.7 de Resultados). El PMA es un inductor inespecífico de diversas cascadas de señalización que afecta la activación de varios factores celulares, entre ellos NF- κ B en células Jurkat. El TNF- α es una citoquina más específica implicada en procesos de apoptosis celular, que induce la activación del factor celular NF- κ B. En nuestro caso, no pudimos utilizar TNF- α por no producir la estimulación de la línea celular Jurkat en experimentos previos.

Estos datos contradictorios en relación a estudios anteriores podrían ser debidos a la línea celular y estímulo utilizado en cada caso. Así, un trabajo previo demostró que el “fitness” viral de distintos subtipos del VIH-1, determinado por LTRs específicas de las diferentes variantes, dependía tanto del tipo de célula hospedadora infectada como del estado de activación celular (van Opijnen et al., 2004). Un ambiente replicativo distinto, con expresión de factores de transcripción diferentes, podría conducir a diferencias en la actividad transcripcional de virus con distintos patrones de secuencias LTR.

La menor actividad transcripcional inducida por PMA en células Jurkat con el subtipo D en relación al HXB2 y resto de subtipos, podría ser debido al tipo de línea celular y estímulo utilizado, ya que no encontramos una relación entre el nivel de activación del promotor y cambios específicos en su secuencia.

6.5.3. Inducida por Tat

La proteína viral Tat del subtipo B del VIH-1 fue capaz de inducir la transcripción viral de todos los subtipos no-B y formas recombinantes que fueron analizadas. Sin embargo, al igual que algunos estudios anteriores, no encontramos diferencias en la actividad transcripcional del LTR en presencia de la proteína viral Tat del subtipo B (Naghavi et al., 1999; Jeeninga et al., 2000). Dado que diversos estudios han mostrado diferencias en la capacidad de transactivación de distintas proteínas Tat de los subtipos B, C y recombinante CRF01_AE, (Roof et al., 2002; Kurosu et al., 2002; Desfosses et al., 2005), se necesitan estudios que examinen la inducción de actividad del LTR con las proteínas Tat específicas de cada variante.

En los promotores LTR con subtipo D y H analizados, la actividad transcripcional inducida por Tat fue menor en relación a la actividad del promotor del aislado HXB2 (ver Figura 5.8). Sin embargo, no encontramos cambios específicos en las secuencias TAR de dichas muestras en relación al HXB2 que pudieran disminuir la afinidad de unión de Tat o de los factores celulares (ciclina T1 y CDK9) necesarios para la transcripción viral, y por tanto, producir una menor actividad. Dado que la transactivación de dichos promotores se llevó a cabo con la proteína viral Tat del subtipo B, no podemos descartar que dichos promotores pudieran ser más activos *in vitro* o *in vivo* en presencia de las proteínas Tat específicas de cada subtipo. Ya que dichas proteínas Tat necesitan interaccionar con determinados cofactores celulares, como el complejo Ciclina T1/CDK9, para producir una transactivación eficaz, cambios genéticos en sus secuencias podrían disminuir su

capacidad de transactivación. Por otro lado, el clonaje de todas las proteínas Tat de las variantes del VIH-1 para realizar los ensayos funcionales reviste una gran complejidad. Ello se debe a que sus dos exones (separados en el genoma ARN viral) necesitan ser clonados conjuntamente a partir de ADNc, lo que es técnicamente difícil. De hecho existen pocos vectores que expresen Tat de otros subtipos no-B (Roof et al., 2002; Kurosu et al., 2002). Ya que la actividad de los diferentes promotores se llevó a cabo en una determinada línea celular, no sabemos lo que ocurriría si hubiéramos medido la actividad de las mismas construcciones plasmídicas en líneas celulares diferentes.

6.6. Actividad transcripcional “*in vitro*” de los promotores LTR hipermutados

Estudios previos vieron que múltiples cambios del nucleótido guanina a adenina en los sitios Sp1, NF- κ B y TAR del LTR producían una inactivación de la transcripción viral, al no detectarse actividad en dichos promotores (Zhang et al., 1997a). Dichos cambios fueron similares a los obtenidos en algunos de nuestros clones de las secuencias LTR del paciente nº 37 (con subtipo G) y del paciente nº 20 (con subtipo D) (Figura 5.9), donde el nivel de actividad transcripcional tanto basal como inducido también estaban disminuidos. El alto grado de variabilidad genética en las secuencias promotoras del LTR debido a cambios del nucleótido G a A en sitios importantes para la regulación de la transcripción viral, podría comprometer la actividad de dicho promotor, disminuyendo así la transcripción de los genes del VIH-1, y por tanto, la capacidad replicativa de dichos virus.

Ciertos cambios en sitios importantes para el inicio y elongación de la transcripción de los genes del VIH, podrían producir una ineficaz interacción de los factores celulares y virales con sus secuencias de unión, inhibiendo la transcripción viral.

Se han correlacionado altos niveles de expresión de la proteína celular APOBEC3G, citidina deaminasa que produce hipermutación en la célula hospedadora, con la presencia de hipermutación (G → A) en determinados genes virales del VIH-1, produciendo una disminución en la carga viral de los pacientes (Jin et al., 2005). La determinación de niveles de ARNm de APOBEC3G no se pudo realizar en nuestros pacientes con muestras hipermutadas, por falta de muestra para realizar los ensayos necesarios.

7. Conclusiones

1. Algunos de los cambios genéticos encontrados en determinadas regiones del promotor LTR en las diferentes variantes del VIH-1 estudiadas, representan patrones de secuencias específicos que se repiten en todas las muestras analizadas con idéntico subtipo genético. Esta observación corrobora que la clasificación de las diferentes variantes del VIH-1 se puede realizar mediante el análisis filogenético de las secuencias promotoras LTR.
2. El elevado contenido en los nucleótidos adenina y timina en el sitio de unión del factor celular Sp1 en virus que infectan a pacientes LTNP (particularmente en los no progresores) podría estar ligado a una menor afinidad de unión de dicho factor, esencial para la activación transcripcional del VIH-1.
3. Todos los promotores LTR de las variantes del VIH-1 analizadas en células Jurkat fueron funcionales, presentando una actividad transcripcional “*in vitro*” similar, tanto a nivel basal como en presencia de la proteína viral transactivadora Tat.
4. La actividad basal del promotor LTR en todas las variantes del VIH-1 analizadas fue fuertemente inducida cuando se estimuló en presencia de PMA y Tat, demostrando así un efecto sinérgico entre la proteína Tat y la activación celular.
5. La proteína Tat del subtipo B del VIH-1 es capaz de inducir la transcripción viral de todas las variantes no-B que fueron analizadas en células Jurkat.

6. Los cambios del nucleótido guanina a adenina en sitios importantes del LTR para la regulación de la transcripción viral, parecen comprometer la actividad de dicho promotor, disminuyendo la transcripción viral de los genes del VIH-1.

8. Bibliografía

Alcamí, J., Lain, D. L., Folgueira, L., Pedraza, M. A., Jacque, J. M., Bachelier, F., Noriega, A. R., Hay, R. T., Harrich, D., and Gaynor, R. B. (1995). Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO J.* 14, 1552-1560.

Azevedo-Pereira, J. M., Santos-Costa, Q., and Moniz-Pereira, J. (2005). HIV-2 infection and chemokine receptors usage - clues to reduced virulence of HIV-2. *Curr. HIV. Res.* 3, 3-16.

Baeten, J. M., Chohan, B., Lavreys, L., Chohan, V., McClelland, R. S., Certain, L., Mandaliya, K., Jaoko, W., and Overbaugh, J. (2007). HIV-1 Subtype D Infection Is Associated with Faster Disease Progression than Subtype A in Spite of Similar Plasma HIV-1 Loads. *J. Infect. Dis.* 195, 1177-1180.

Barré-Sinoussi, F., Cherman, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., and Gruest, J. (1983). Isolation of a T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Science* 220, 868-871.

Bassuk, A. G., Anandappa, R. T., and Leiden, J. M. (1997). Physical Interactions between Ets and NF-kB/NFAT proteins play an important Role in their cooperative activation of the human immunodeficiency virus enhancer in T cells. *J. Virol.* 71, 3563-3573.

Battistini, A., Marsili, G., Sgarbanti, M., Ensoli, B., and Hiscott, J. (2002). IRF Regulation of HIV-1 Long Terminal Repeat Activity. *J. Interferon Cytokine Res.* 22, 27-37.

Bell, B. and Sadowski, I. (1996). Ras-responsiveness of the HIV-1 LTR requires RBF-1 and RBF-2 binding sites. *Oncogene* 13, 2687-2697.

Bieniasz, P. D., Grdina, T. A., Bogerd, H. P., and Cullen, B. R. (1999). Recruitment of cyclin T1/P-TEFb to an HIV type 1 long terminal repeat promoter proximal RNA target is both necessary and sufficient for full activation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7791-6.

Blackbourn, D. J., Mackewicz, C. E., Barker, E., Hunt, T. K., Herndier, B., Haase, A. T., and Levy, J. A. (1996). Suppression of HIV replication by lymphoid tissue CD8+ cells correlates with the clinical state of HIV-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13125-13130.

Centlivre, M., Sommer, P., Michel, M., Ho Tsong, F. R., Gofflo, S., Valladeau, J., Schmitt, N., Thierry, F., Hurtrel, B., Wain-Hobson, S., and Sala, M. (2005). HIV-1 clade promoters strongly influence spatial and temporal dynamics of viral replication in vivo. *J. Clin. Invest.* 115, 348-358.

Centlivre, M., Sommer, P., Michel, M., Ho Tsong, F. R., Gofflo, S., Valladeau, J., Schmitt, N., Wain-Hobson, S., and Sala, M. (2006). The HIV-1 clade C promoter is particularly well adapted to replication in the gut in primary infection. *AIDS* 20, 657-666.

Chang, L. and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.

Chen, P., Flory, E., Avots, A., Jordan, B. W. M., Kirchhoff, F., Ludwig, S., and Rapp, U. R. (2000). Transactivation of Naturally Occurring HIV-1 Long Terminal Repeats by JNK Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 20382-20390.

Colson, P., Tamalet, C., and Raoult, D. (2006). SVARAP and aSVARAP: simple tools for quantitative analysis of nucleotide and amino acid variability and primer selection for clinical microbiology. *BMC. Microbiol.* 6, 21.

Cullen, B. (1998). HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 93, 685-92.

De Baar, M. P., De Ronde, A., Berkhout, B., Cornelissen, M., Van der Horn, K. H. M., Van der Schoot, A. M., De Wolf, F., Lukashov, V. V., and Goudsmit, J. (2000). Subtype-specific Sequence Variation of the HIV-1 type 1 Long terminal Repeat and Primer- binding site. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 16, 499-504.

Deacon, N. J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D. J., McPhee, D. A., Greenway, A. L., Ellett, A., Chatfield, C., Lawson, V. A., Crowe, S., Maerz, A., Sonza, S., Learmont, J., Sullivan, J. S., Cunningham, A., Dwyer, D., Dowton, D., and Mills, J. (1995). Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270, 988-991.

Desfosses, Y., Solis, M., Sun, Q., Grandvaux, N., Van Lint, C., Burny, A., Gatignol, A., Wainberg, M. A., Lin, R., and Hiscott, J. (2005). Regulation of human immunodeficiency virus type 1 gene expression by clade-specific Tat proteins. *J. Virol.* 79, 9180-9191.

El Kharroubi, A. and Martin, M. A. (1996). Cis- Acting Sequences Located Downstream of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Promoter Affect Its Chromatin Structure and Transcriptional Activity. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2958-2966.

Emerman, M. and Malim, M. H. (1998). HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 280, 1880-1884.

Estable, M. C., Estable, M. C., Hirst, M., Bell, B., O'Shaughnessy, M. V., and Sadowski, I. (1999). Purification of RBF-2, a Transcription Factor with Specificity for the most Conserved cis-Element of Naturally Occurring HIV-1 LTRs. *Biomed. Sci.* 6, 320-332.

Estable, M. C., Hirst, B. B., and Sadowski, I. (1998). Naturally occurring Human Immunodeficiency Virus Types 1 Long Terminal Repeats Have a frequently observed duplication that binds RBF-2 and represses Transcription. *J. Virol.* 72, 6465-6474.

Estable, M. C., Merzouki, B. B., Montaner, J. S, Shaughnessy, M. V., and Sadowski, I. J. (1996). Human Immunodeficiency Virus type 1 Long terminal Repeat Variants from 42 Patients representing all stages of infection display a wide range of polymorphism and transcription activity. *J. Virol.* 70, 4053-4062.

Fang, G., Burger, H., Chappey, C., Rowland-Jones, S., Vidosky, A., Chen, C. H., Moran, T., Townsend, L., Murray, M., and Weiser, B. (2001). Analysis of transition from long-term nonprogressive to progressive infection identifies sequences that may attenuate HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 1395-1404.

Gao, F., Robertson, D. L., Morrison, S. G., Hui, H., Craig, S., Decker, J., Fultz, P. N., Girard, M., Shaw, G. M., Hahn, B. H., and Sharp, P. M. (1996). The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J. Virol.* 70, 7013-7029.

Gao, F., Vidal, N., Li, Y., Trask, S. A., Chen, Y., Kostrikis, L. G., Ho, D. D., Kim, J., Oh, M. D., Choe, K., Salminen, M., Robertson, D. L., Shaw, G. M., Hahn, B. H., and Peeters, M. (2001). Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 675-88.

García, J. A., Harrich, D., Pearson, L., Mitsuyasu, R., and Gaynor, R. B. (1988). Functional domains required for tat-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *EMBO J.* 7, 3143-3147.

García, J. A., Wu, F. K., Mitsuyasu, R., and Gaynor, R. B. (1987). Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J.* 6, 3761-3770.

García-Martínez, L. F., Mavankal, G., Neveu, J. M., Lane, W. S., Ivanov, D., and Gaynor, R. B. (1997). Purification of a Tat-associated kinase reveals a TFIIH complex that modulates HIV-1 transcription. *EMBO J.* 16, 2836-2850.

Gatignol, A., Buckler-White, A., Berkhout, B., and Jeang, K. T. (1991). Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* 251, 1597-1600.

Gaynor, R. B. (1992). Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS* 6, 347-363.

Gaynor, R. B. (1995). Regulation of HIV-1 gene expression by the transactivator protein Tat. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 193, 51-77.

Geretti, A. M. (2006). HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19, 1-7.

Gregor, P. D., Sawadogo, M., and Roeder, R. G. (1990). The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev.* 4, 1730-1740.

Harrich, D., Garcia, J., Wu, F., Mitsuyasu, R., Gonazalez, J., and Gaynor, R. (1989). Role of SP1-binding domains in in vivo transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J. Virol.* 63, 2585-2591.

Hazan, U., Thomas, D., Alcamí, J., Bachelierie, F., Israel, N., Yssel, H., Virelizier, J. L., and Arenzana-Seisdedos, F. (1990). Stimulation of a human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF-kappa B translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 7861-7865.

Hiebenthal-Millow, K. and Kirchhoff, F. (2002). The most frequent naturally occurring length polymorphism in the HIV-1 LTR has little effect on proviral transcription and viral replication. *Virology* 292, 169-175.

Holguín, A., Alvarez, A., Pena, M. J., Artiles, F., Molina, L., and Soriano, V. (2003). HIV-positive immigrants in the Canary Islands, Spain: implications for public health in Europe. *HIV. Clin. Trials* 4, 184-192.

Holguín, A., Alvarez, A., and Soriano, V. (2005a). Differences in the length of gag proteins among different HIV type 1 subtypes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 886-893.

Holguín, A., Alvarez, A., and Soriano, V. (2005b). Heterogeneous nature of HIV-1 recombinants spreading in Spain. *J. Med. Virol.* 75, 374-380.

Holguín, A., de Mendoza, C., and Soriano, V. (1999). Comparison of three different commercial methods for measuring plasma viraemia in patients infected with non-B HIV-1 subtypes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 256-259.

Holguín, A., Lospitao, E., Ramírez de Arellano, E., López M, Martín C, and Soriano, V. (2007). Genetic Characterisation of Complex Inter-Recombinant HIV-1 Strains Circulating in Spain and Reliability of Distinct Rapid Subtyping Tools. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (enviado a publicar).

Holguín, A., Paxinos, E., Hertogs, K., Womac, C., and Soriano, V. (2004). Impact of frequent natural polymorphisms at the protease gene on the in vitro susceptibility to protease inhibitors in HIV-1 non-B subtypes. *J. Clin. Virol.* 31, 215-220.

Holguín, A., Ramírez de Arellano, E., Rivas, P., and Soriano, V. (2006). Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtypes. *AIDS Rev.* 8, 98-107.

Hue, S., Clewley, J. P., Cane, P. A., and Pillay, D. (2004). HIV-1 pol gene variation is sufficient for reconstruction of transmissions in the era of antiretroviral therapy. *AIDS* 18, 719-728.

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

Iversen, A. K., Shpaer, E. G., Rodrigo, A. G., Hirsch, M. S., Walker, B. D., Sheppard, H. W., Merigan, T. C., and Mullins, J. I. (1995). Persistence of attenuated rev genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected asymptomatic individual. *J. Virol.* 69, 5743-5753.

Janssens, W., Buve, A., and Nkengasong, J. N. (1997). The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa. *AIDS* 11, 705-712.

Jeeninga, R. E., Hoogenkamp, M., Armand-Ugon, M., De Baar, M. P., Verhoef, K., and Berkhout, B. (2000). Functional Differences between the long terminal repeat

transcriptionla promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J. Virol.* 74, 3740-3751.

Jin, X., Brooks, A., Chen, H., Bennett, R., Reichman, R., and Smith, H. (2005). APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA levels associate inversely with human immunodeficiency virus viremia. *J. Virol.* 79, 11513-11516.

Jones, K. A., Kadonaga, J. T., Luciw, P. A., and Tjian, R. (1986). Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, SP1. *Science* 232, 755-759.

Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R., and Tjian, R. (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51, 1079-1090.

Kinoshita, S., Su, L., Amano, M., Timmerman, L. A., Kaneshima, H., and Nolan, G. P. (1997). The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity*. 6, 235-244.

Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Hamacher, M., Sullivan, J. L., and Desrosiers, R. C. (1997). Activity of human immunodeficiency virus type 1 promoter/TAR regions and tat1 genes derived from individuals with different rates of disease progression. *Virology* 232, 319-331.

Koken, S. E., van Wamel, J. L., Geelen, J. L., and Berkhout, B. (1994). Functional Analysis of the ACTGCTGA sequence motif in the Human Immunodeficiency Virus Type-1 Long Terminal Repeat Promoter. *J. Biomed. Sci.* 1, 83-92.

Koken, S. E., van Wamel, J. L., Goudsmit, J., Berkhout, B., and Geelen, J. M. C. (1992). Natural Variants of the HIV-1 Long Terminal Repeat : Analysis of Promoters with Duplicated DNA Regulatory Motifs. *Virology* 191, 968-972.

Kondo, M., Shima, T., Nishizawa, M., Sudo, K., Iwamuro, S., Okabe, T., Takebe, Y., and Imai, M. (2005). Identification of attenuated variants of HIV-1 circulating recombinant form 01_AE that are associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the nef/long terminal repeat sequences. *J. Infect. Dis.* 192, 56-61.

Kurosu, T., Mukai, T., Komoto, S., Ibrahim, M. S., Li, Y. G., Kobayashi, T., Tsuji, S., and Ikuta, K. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 subtype C exhibits higher transactivation activity of Tat than subtypes B and E. *Microbiol. Immunol.* 46, 787-799.

Levy, J. A. (1993). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* 57, 183-289.

Lospitao, E., Alvarez, A., Soriano, V., and Holguín, A. (2005). HIV-1 subtypes in Spain: a retrospective analysis from 1995 to 2003. *HIV. Med.* 6, 313-320.

Lospitao, E., Holguín, A., and Soriano, V. (2003). Secuencias Largas repetidas terminales de los retrovirus: estructura y función. *Med. Clin.* 121, 74-77.

Lum, J. J., Cohen, O. J., Nie, Z., Weaver, J. G., Gomez, T. S., Yao, X. J., Lynch, D., Pilon, A. A., Hawley, N., Kim, J. E., Chen, Z., Montpetit, M., Sanchez-Dardon, J., Cohen, E. A., and Badley, A. D. (2003). Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J. Clin. Invest.* 111, 1547-1554.

Macian, F. and Rao, A. (1999). Reciprocal modulatory interaction between human immunodeficiency virus type 1 Tat and transcription factor NFAT1. *Mol. Cell Biol.* 19, 3645-3653.

McCutchan, F. E. (2006). Global epidemiology of HIV. *J. Med. Virol.* 78 *Suppl 1*, S7-S12.

Michael, N. L., Chang, G., d'Arcy, L. A., Ehrenberg, P. K., Mariani, R., Busch, M. P., Birx, D. L., and Schwartz, D. H. (1995). Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected long-term survivor lacking recoverable virus. *J. Virol.* 69, 4228-4236.

Michael, N. L., d'Arcy, L. A., Ehrenberg, P. K., and Redfield, R. R. (1994). Naturally Occurring Genotypes of the Human Immunodeficiency Virus type 1 Long Terminal Repeat Display a Wide Range of Basal and Tat-Induced Transcriptional Activities. *J. Virol.* 68, 3163-3174.

Modesti, N., Garcia, J., Debouck, C., Peterlin, M., and Gaynor, R. (1991). Trans-dominant Tat mutants with alterations in the basic domain inhibit HIV-1 gene expression. *New Biol.* 3, 759-768.

Montano, M. A., Nixon, C. P., and Essex, M. (1998). Dysregulation through the NF- κ B Enhancer and TATA box of the human immunodeficiency Virus type 1 subtype E promoter. *J. Virol.* 72, 8446-8452.

Montano, M. A., Novitsky, V. A., Blackard, J. T., Cho, N. L., Katzenstein, D. A., and Essex, M. (1997). Divergent transcriptional regulation among expanding VIH-1 subtypes. *J. Virol.* 71, 8657-8665.

Nabel, G. and Baltimore, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* 326, 711-713.

Naghavi, M. H., Estable, M. C., Schwartz, S., Roeder, R. G., and Vahlne, A. (2001). Upstream stimulating factor affects human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-directed transcription in a cell-specific manner, independently of the HIV-1 subtype and the core-negative regulatory element. *J. Gen. Virol.* 82, 547-559.

Naghavi, M. H., Schwartz, S., Sönnnerborg, A., and Ahlne, A. (1999). Long terminal Repeat Promotor/Enhancer activity of different subtypes of HIV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15, 1293-1303.

Pande, V. and Ramos, M. J. (2003). Nuclear factor kappa B: a potential target for anti-HIV chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* 10, 1603-1615.

Peeters, M. (2000). Recombinant HIV sequences: their role in the global epidemic. HIV sequence compedium.

Pereira, L., Bentley, K., Churchill, P. A., and Deacon, N. (1999). A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res.* 28, 663-668.

Perkins, N. D., Edwards, N. L., Duckett, C. S., Agranoff, A. B., Schmid, R. M., and Nabel, G. J. (1993). A cooperative interaction between NF-Kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.* 12, 3551-3558.

Pilgrim, A. K., Pantaleo, G., Cohen, O. J., Fink, L. M., Zhou, J. Y., Zhou, J. T., Bolognesi, D. P., Fauci, A. S., and Montefiori, D. C. (1997). Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J. Infect. Dis.* 176, 924-932.

Quinones-Mateu, M. E., Mas, A., Lain, d. L., Soriano, V., Alcamí, J., Lederman, M. M., and Domingo, E. (1998). LTR and tat variability of HIV-1 isolates from patients with divergent rates of disease progression. *Virus Res.* 57, 11-20.

Ramírez de Arellano, E., Martin, C., Soriano, V., Alcamí, J., and Holguín, A. (2006a). Genetic analysis of the long terminal repeat (LTR) promoter region in HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression. *Virus Genes* 34, 111-6.

Ramírez de Arellano, E., Soriano, V., Alcamí, J., and Holguín, A. (2006b). New findings on transcription regulation across different HIV-1 subtypes. *AIDS Rev.* 8, 9-16.

Ramírez de Arellano, E., Soriano, V., and Holguín, A. (2005). Genetic analysis of regulatory, promoter, and TAR regions of LTR sequences belonging to HIV type 1 Non-B subtypes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 949-954.

Rodes, B., Toro, C., Paxinos, E., Poveda, E., Martinez-Padial, M., Benito, J. M., Jimenez, V., Wrin, T., Bassani, S., and Soriano, V. (2004). Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *AIDS* 18, 1109-1116.

Rohr, O., Marban, C., Aunis, D., and Schaeffer, E. (2003). Regulation of HIV-1 gene Transcription: from lymphocytes to microglial cells. *J. Leukoc. Biol.* 74, 736-749.

Roof, P., Ricci, M., Genin, P., Montano, M. A., Essex, M., Wainberg, M. A., Gatignol, A., and Hiscott, J. (2002). Differential regulation of HIV-1 Clade-Specific B,C, and E Long Terminal Repeats by NF-kB and the Tat transactivator. *Virology* 296, 77-83.

Rullas, J., Bermejo, M., Garcia-Perez, J., Beltan, M., Gonzalez, N., Hezareh, M., Brown, S. J., and Alcamí, J. (2004). Prostratin induces HIV activation and downregulates HIV receptors in peripheral blood lymphocytes. *Antivir. Ther.* 9, 545-554.

Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G., and Parmentier, M. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382, 722-725.

Sawadogo, M. and Roeder, R. G. (1985). Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* 43, 165-175.

Schwartz, O., Virelizier, J. L., Montagnier, L., and Hazan, U. (1990). A microtransfection method using the luciferase-encoding reporter gene for the assay of human immunodeficiency virus LTR promoter activity. *Gene* 88, 197-205.

Seelamgari, A., Maddukuri, A., Berro, R., de la Fuente, C., Kehn, K., Deng, L., Dadgar, S., Bottazzi, M. E., Ghedin, E., Pumfery, A., and Kashanchi, F. (2004). Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci.* 9, 2388-2413.

Sieweke, M. H., Tekotte, H., and Graf, T. (1998). Cooperative interaction of Ets-1 and USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *EMBO J.* 17, 1728-1739.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

Thomson, M. M. and Najera, R. (2005). Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev.* 7, 210-224.

Tscherning, C., Alaeus, A., Fredriksson, R., Bjorndal, A., Deng, H., Littman, D. R., Fenyo, E. M., and Albert, J. (1998). Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology* 241, 181-188.

Van Lint, C., Amella, C. A., Emiliani, S., John, M., Jie, T., and Verdin, E. (1997). Transcription Factor Binding sites Downstream of the Human immunodeficiency Virus Type 1 Transcription Start site are Important for Virus Infectivity. *J. Virol.* 71, 6113-6127.

Van Opijnen, T., Jeeninga, R. E., Boerlijst, M. C., Pollakis, G. P., Zetterberg, V., Salminen, M., and Berkhout, B. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 subtypes have a distinct long terminal repeat that determines the replication rate in a host-cell-specific manner. *J. Virol.* 78, 3675-3683.

Verhoef, K., Sanders, R. W., Fontaine, V., Kitajima, S., and Berkhout, B. (1999). Evolution of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat promoter by conversion of an NF-kappaB enhancer element into a GABP binding site. *J. Virol.* 73, 1331-1340.

Visco-Comandini, U., Yun, Z., Vahlne, A., and Sonnerborg, A. (1999). No association of HIV type 1 long terminal repeat sequence pattern with long-term nonprogression and in vivo viral replication levels in European subjects. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15, 609-617.

Westby, M., Manca, F., and Dalgleish, A. G. (1996). The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection. *Immunol. Today* 17, 120-126.

Yang, X., Chen, Y., and Gabuzda, D. (1999). ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 274, 27981-27988.

Zhang, L., Huang, Y., Yuan, H., Chen, B. K., Ip, J., and Ho, D. D. (1997a). Genotypic and phenotypic characterization of long terminal repeat sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 71, 5608-5613.

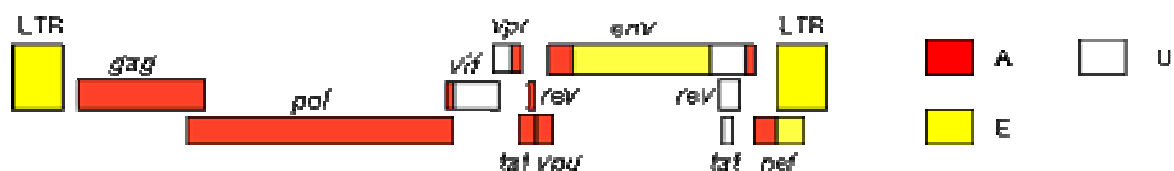
Zhang, L., Huang, Y., Yuan, H., Chen, B. K., Ip, J., and Ho, D. D. (1997b). Identification of a replication-competent pathogenic human immunodeficiency virus type 1 with a duplication in the TCF-1alpha region but lacking NF-kappaB binding sites. *J. Virol.* 71, 1651-1656.

9. Anexos

Anexo 1: Patrón de recombinación del genoma completo
de las variantes CRF01_AE, CRF02_AG, CRF04_cpx,
CRF06_cpx y CRF11_cpx.

Patrón de recombinación del genoma completo de las variantes
(<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/CRFs/CRFs.html>):

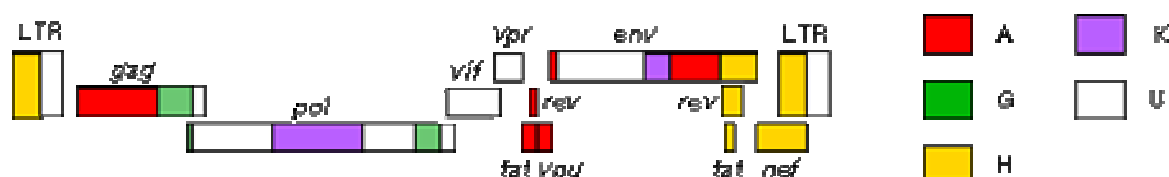
CRF01_AE:



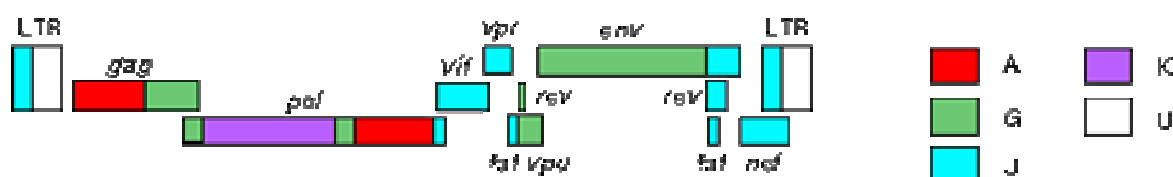
CRF02_AG:



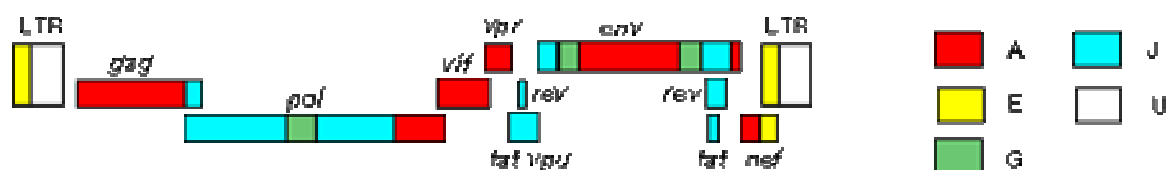
CRF04_cpx:



CRF06_cpx:



CRF11_cpx:



Anexo 2: Publicaciones surgidas de esta Tesis .

1. Holguín A, Lospitao E, [Ramírez de Arellano E](#), López M, Martín C, and Soriano V. **Genetic Characterisation of Complex Inter-Recombinant HIV-1 Strains Circulating in Spain and Reliability of Distinct Rapid Subtyping Tools.** AIDS Res. Hum. Retroviruses (enviado a publicar).
2. [Ramírez de Arellano E](#), Benito JM, Soriano V, López M and Holguín A. **Impact of ethnicity and HIV-1 subtype on response to first-line antiretroviral therapy.** AIDS Res. Hum. Retroviruses, 2007;23 (en prensa).
3. Holguín A, [Ramírez de Arellano E](#) and Soriano V. **Amino Acid conservation in the Gp41 Transmembrane Protein and Nature polymorphisms Associated with Enfuvirtide Resistance Across HIV-1 Variants.** AIDS Res. Hum. Retroviruses, 2007 (en prensa).
4. [Ramírez de Arellano E](#), Martín C, Soriano V, Alcamí J. and Holguín A. **Genetic analysis of the long terminal repeat (LTR) promoter region in HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression.** Virus Genes, 2007;34:111-6.
5. [Ramírez de Arellano E](#); Soriano V; Alcamí J and Holguín A. **New findings on transcription regulation across different HIV-1 subtypes.** AID Reviews 2006;8:9-16.

6. Holguín A, [Ramírez de Arellano E](#), Rivas P, and Soriano V. **Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtypes.** AIDS Rev 2006;8, 98-107.

7. [Ramírez de Arellano, E](#); Soriano V and Holguín A. **Genetic analysis of regulatory, promoter, and TAR regions of LTR sequences belonging to HIV type 1 Non-B subtypes.** AIDS Res. Hum. Retroviruses 2005;21:949-54.

8. [Ramírez de Arellano E](#); Soriano V and Holguín A. **Regulation of transcription in different HIV-1 subtypes.** Enferm Infecc. Microbiol. Clin. 2004; 23:149-55.

10. Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNds: Ácido desoxirribonucleico de doble cadena

Ap1: "Activator protein", proteína activadora 1

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica

CMV: Citomegalovirus

GLS: "Gag Leader sequence", secuencia líder de Gag

LTNP: "Long term non progressor", pacientes progresores lentos

LTR: "Long Terminal Repeat", secuencias terminales largas repetidas

MAP: "Mitogen-activated Protein", proteína activadora de mitógenos

MFNLP: "Most frequent naturally length polymorphism", polimorfismos naturales más frecuentes

NCBI: "National Center for Biotechnology Information", Centro Nacional de Información Biotecnológica.

NF κ B: Factor nuclear Kappa B

NFAT-1: Factor nuclear de células T activadoras

NP: "Non progressor", no progresor

NRE: Elemento de regulación negativa

PBS: "Phosphate Buffered Saline", buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PMA: "Phorbol 12-Myristato 13-Acetato"

PR: Proteasa

RBF 1: Factor de respuesta a Ras

RE: Retículo endoplasmático

RER: Retículo endoplasmático rugoso

URL: Unidades relativas de luciferasa

RT: Retrotranscriptasa

SP: "Show progressor", progresor lento

Sp1: Proteína específica 1

TAR: "Trans-activation region", región transactivadora

Tat: "Trans-activator of transcription", transactivador de la transcripción

TBP: "Tata binding Protein", proteínas de unión a la región TATA.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral

USF: "Upstream stimulator protein"

VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

VIS: Virus de la inmunodeficiencia de simio